



## MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】	(19)[ISSUING COUNTRY]
日本国特許庁 (J P)	Japan Patent Office (JP)
(12)【公報種別】	(12)[GAZETTE CATEGORY]
公開特許公報 (A)	Laid-open Kokai Patent (A)
(11)【公開番号】	(11)[KOKAI NUMBER]
特 開	Unexamined Japanese Patent
2001-86982(P2001-86982A)	2001-86982(P2001-86982A)
(43)【公開日】	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]
平成 1 3 年 4 月 3 日 ( 2 0 0 1 . 4 . 3 )	April 3 (2001. 4.3), Heisei 13
(54)【発明の名称】	(54)[TITLE OF THE INVENTION]
骨吸収調節薬	Bone-resorption regulating drug
(51)【国際特許分類第 7 版】	(51)[IPC 7]
C12N 5/02	C12N 5/02
A61K 38/22	A61K 38/22
45/00	45/00
A61P 19/08	A61P 19/08
19/10	19/10
35/00	35/00
43/00 101	43/00 101
105	105
C12Q 1/04	C12Q 1/04
G01N 33/15	G01N 33/15
33/50	33/50



33/566

33/566

## 【FI】

C12N 5/02

A61K 45/00

A61P 19/08

## [FI]

C12N 5/02

A61K 45/00

A61P 19/08

19/10

19/10

35/00

35/00

43/00 101

43/00 101

105

105

C12Q 1/04

C12Q 1/04

G01N 33/15 Z

G01N 33/15 Z

33/50 Z

33/50 Z

X

X

33/566

33/566

A61K 37/24

A61K 37/24

【審査請求】 未請求

[REQUEST FOR EXAMINATION] No

【請求項の数】 2 3

[NUMBER OF CLAIMS] 23

【出願形態】 O L

[FORM OF APPLICATION] Electronic

【全頁数】 1 6

[NUMBER OF PAGES] 16

(21) 【出願番号】

(21)[APPLICATION NUMBER]

特 願

Japanese Patent Application

2000-191075(P2000-191075)

2000-191075(P2000-191075)

(22) 【出願日】

(22)[DATE OF FILING]

平成12年6月21日 (2000. 6. 21)

June 21 (2000. 6.21), Heisei 12



(31) 【優先権主張番号】  
特願平 11-203899

(31)[FOREIGN PRIORITY APPLICATION  
NUMBER]

Japanese Patent Application Heisei 11-203899

(32) 【優先日】  
平成 11 年 7 月 16 日 (1999. 7. 16)

(32)[FOREIGN PRIORITY DATE]

July 16 (1999. 7.16), Heisei 11

(33) 【優先権主張国】  
日本 (JP)

(33)[COUNTRY OF FOREIGN PRIORITY]  
(JP)

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】  
599100545

[ID CODE]  
599100545

【氏名又は名称】  
新飯田 俊平

[NAME OR APPELLATION]  
Niida, Shunpei

【住所又は居所】  
広島県広島市南区宇品神田 3 丁目 8-24-301

[ADDRESS OR DOMICILE]

(71) 【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】  
000203254

[ID CODE]  
000203254

【氏名又は名称】  
村上 和雄

[NAME OR APPELLATION]  
Murakami, Kazuo

【住所又は居所】  
茨城県つくば市観音台 1 丁目 3  
7-16

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]



**【氏名】**

新飯田 俊平

**[NAME OR APPELLATION]**

Niida, Shunpei

**【住所又は居所】**

広島県広島市南区宇品神田3丁目  
8-24-301

**[ADDRESS OR DOMICILE]**

**(72) 【発明者】**

**(72)[INVENTOR]**

**【氏名】**

前田 憲彦

**[NAME OR APPELLATION]**

Maeda, Norihiko

**【住所又は居所】**

広島県広島市東区牛田本町6丁目  
1-9-305

**[ADDRESS OR DOMICILE]**

**(74) 【代理人】**

**(74)[AGENT]**

**【識別番号】**

100102978

**[ID CODE]**

100102978

**【弁理士】**

**[PATENT ATTORNEY]**

**【氏名又は名称】**

清水 初志 (外1名)

**[NAME OR APPELLATION]**

Shimizu, Hatsushi (and 1 other)

**(57) 【要約】**

**(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]**

**【課題】**

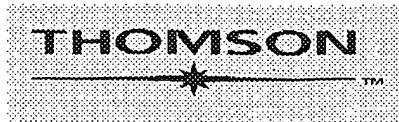
破骨細胞による骨吸収を調節する薬剤およびそのスクリーニング方法を提供することを課題とする。

**[SUBJECT OF THE INVENTION]**

It makes a subject to offer the drug which regulates the bone resorption by the osteoclast, and its screening procedure.

**【解決手段】**

**[PROBLEM TO BE SOLVED]**



血管内皮増殖因子 (VEGF) が、破骨細胞の形成、生存を促進する活性を有することを見出した。この活性は、血管内皮増殖因子受容体 1 型 (VEGFR-1) を介していた。また、M-CSF 欠損マウスの VEGFR-1 の活性化を阻害することにより、破骨細胞を減少させることに成功した。本発明により、VEGFR-1 の活性化を調節する薬剤を用いて破骨細胞の形成や生存を制御し、骨吸収の異常を伴う疾患を治療することが可能となる。

It discovered that the vascular, endothelial growth factor (VEGF) has the activity which promotes formation and survival of the osteoclast. This activity was through the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type (VEGFR-1). Moreover, it succeeded in decreasing the osteoclast by obstructing activation of VEGFR-1 of a M-CSF deficient mouse. This invention enables to control formation and survival of the osteoclast by using the medicine which adjusts activation of VEGFR-1 and to treat the illness accompanying the deviation of the bone resorption.

**【特許請求の範囲】****[CLAIMS]****【請求項 1】**

破骨細胞の分化を誘導する方法であって、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物の存在下で培養することを特徴とする方法。

**[CLAIM 1]**

It is the method of inducing the differentiation of osteoclasts, and culturing the cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor in the presence of the compound which activates this type 1 vascular endothelial growth factor receptor. The method characterized by the above-mentioned.

**【請求項 2】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドである、請求項 1 に記載の方法。

**[CLAIM 2]**

The method of Claim 1 wherein the compound which activates type 1 vascular endothelial growth factor receptor is the ligand to type 1 vascular endothelial growth factor receptor.

**【請求項 3】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが、血管内皮

**[CLAIM 3]**

The procedure of Claim 2 in which the ligand to type 1 vascular endothelial growth factor



増殖因子または胎盤増殖因子 1 型である、請求項 2 に記載の方法。  
receptor is type 1 vascular endothelial growth factor or placenta proliferation-factor.

**【請求項 4】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

**[CLAIM 4]**

Procedure in any one of Claim 1 to 3 wherein the cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor is non-adhesive myeloid cells.

**【請求項 5】**

破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 該血管内皮増殖因子受容体 1 型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型との結合を検出する工程、(c) 該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

**[CLAIM 5]**

It is the method of screening the compound which promotes or inhibits a differentiation and survival of the osteoclast and/or the bone resorption and the method containing (a) Process which makes type 1 vascular endothelial growth factor receptor contact type 1 vascular endothelial growth factor or placenta proliferation-factor in test compound presence, (b) Process which detects binding this type 1 vascular endothelial growth factor receptor with this type 1 vascular endothelial growth factor, or placenta proliferation-factor, (c) Process which selects compound which promotes or inhibits this binding.

**【請求項 6】**

破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、お

**[CLAIM 6]**

It is the method of screening the compound which promotes a differentiation and survival of the osteoclast, and/or the bone resorption and the method containing (a) Process which makes cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor contact test compound, (b) Process that detects differentiation and survival of osteoclast, and/or bone resorption, (c) Process that selects compound which



よび／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

promotes this differentiation, survival, and/or bone resorption.

**【請求項 7】**

破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

**[CLAIM 7]**

It is the method of screening the compound which inhibits a differentiation and survival of the osteoclast, and/or the bone resorption and the method containing (a) Process which makes cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor in test compound presence contact type 1 vascular endothelial growth factor or placenta proliferation-factor, (b) Process that detects differentiation and survival of osteoclast, and/or bone resorption, (c) Process that selects compound which inhibits this differentiation, survival, and/or bone resorption.

**【請求項 8】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

**[CLAIM 8]**

The procedure of Claim 6 or 7 wherein the cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor is non-adhesive myeloid cells.

**【請求項 9】**

血管の誘導を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

**[CLAIM 9]**

It is the method of screening the compound which promotes induction of the blood vessel and the method containing (a) Process which makes cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor contact test compound, (b) Process that detects differentiation and survival of osteoclast, and/or bone resorption, (c) Process that selects compound promotes this differentiation, survival, and/or bone resorption.

**【請求項 10】**

血管の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

**[CLAIM 10]**

It is the procedure of screening the compound which obstructs a derivative of the blood vessel and the procedure containing (a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in test compound presence contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, (b) Differentiation of osteoclast, survival, and/or process that detects bone resorption, (c) This differentiation, survival, and/or process that chooses compound which obstructs bone resorption.

**【請求項 11】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項 9 または 10 に記載の方法。

**[CLAIM 11]**

The procedure of Claim 9 or 10 in which the cell which expresses type 1 vascular endothelial growth factor receptor is non-adhesive myeloid cells.

**【請求項 12】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進するための薬剤。

**[CLAIM 12]**

The medicine for promoting a differentiation and survival of the osteoclast, and/or the bone resorption which uses as an active ingredient the compound which activates type 1 vascular endothelial growth factor receptor.

**【請求項 13】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドである、請求項 12 に記載の薬剤。

**[CLAIM 13]**

The medicine of Claim 12 whose compound which activates type 1 vascular endothelial growth factor receptor is the ligand to type 1 vascular endothelial growth factor receptor.

**【請求項 14】****[CLAIM 14]**





血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型である、請求項 1 3 に記載の薬剤。

The medicine of Claim 13 wherein ligand to type 1 vascular endothelial growth factor receptor is type 1 vascular endothelial growth factor or placenta proliferation-factor.

**【請求項 1 5】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、請求項 5 または 6 に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、請求項 1 2 に記載の薬剤。

**[CLAIM 15]**

The medicine of Claim 12 wherein compound which activates type 1 vascular endothelial growth factor receptor is a compound isolated by the screening procedure of Claim 5 or 6.

**【請求項 1 6】**

大理石病、低回転型骨粗鬆症、および骨折からなる群より選択される疾患または傷害の治療のために用いられる、請求項 1 2 から 1 5 のいずれかに記載の薬剤。

**[CLAIM 16]**

The medicine in any one of Claim 12 to 15 used for the treatment of the diseases selected from the group that consists of osteopetrosis, low turnover osteoporosis, and fracture, or a harm.

**【請求項 1 7】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を阻害するための薬剤。

**[CLAIM 17]**

The medicine for inhibiting differentiation and survival of the osteoclast and/or the bone resorption which uses as an active ingredient the compound which inhibits type 1 vascular endothelial growth factor receptor activation.

**【請求項 1 8】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型と血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドとの結合を阻害する化合物である、請求項 1 7

**[CLAIM 18]**

The medicine of Claim 17 which is a compound with which the compound which inhibits type 1 vascular endothelial growth factor receptor activation inhibits the binding the ligand to vascular endothelial growth factor receptor with type 1 vascular endothelial growth factor



に記載の薬剤。

receptor.

**【請求項 19】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子に対する抗体である、請求項 17 に記載の薬剤。

**[CLAIM 19]**

The medicine of Claim 17 wherein compound which inhibits type 1 vascular endothelial growth factor receptor activation is an antibody to a vascular endothelial growth factor.

**【請求項 20】**

血管内皮増殖因子受容体 1 型の活性化を阻害する化合物が、請求項 5 または 7 に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、請求項 17 に記載の薬剤。

**[CLAIM 20]**

The medicine of Claim 17 wherein compound which obstructs type 1 vascular endothelial growth factor receptor activation is a compound isolated by the screening procedure of Claim 5 or 7.

**【請求項 21】**

高回転型骨粗鬆症、骨転移癌、骨肉腫、高カルシウム血症、および慢性関節リウマチにおける骨破壊からなる群より選択される疾患の治療のために用いられる、請求項 17 から 20 のいずれかに記載の薬剤。

**[CLAIM 21]**

The medicine in any one of Claim 17 to 20 used for the treatment of the illness selected from the group that consists of high turnover osteoporosis, bone metastatic cancer, an osteosarcoma, the hypercalcemia, and bone destruction in a rheumatoid arthritis.

**【請求項 22】**

請求項 9 に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、血管誘導促進剤。

**[CLAIM 22]**

The blood-vessel inducing promoter which uses as an active ingredient the compound isolated by the method of Claim 9.

**【請求項 23】**

請求項 10 に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、制癌剤。

**[CLAIM 23]**

The anticancer agent which uses as an active ingredient the compound isolated by the method of Claim 10.



## 【発明の詳細な説明】

## [DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

【 0 0 0 1 】

[0001]

## 【発明の属する技術分野】

## [TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION]

本発明は、血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化誘導系、該分化誘導系を利用した破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物のスクリーニング方法、並びに血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節するための薬剤に関する。

This invention is a differentiation-inducing type of the osteoclast which made the target the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, it is related with the medicine for adjusting the differentiation using this differentiation-inducing type of the osteoclast, survival and/or the screening procedure of a compound of adjusting the bone resorption and a differentiation of the osteoclast which made the target the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, survival, and/or the bone resorption.

【 0 0 0 2 】

[0002]

## 【従来の技術】

## [PRIOR ART]

第3染色体に存在する骨大理石病の原因遺伝子 (osteopetrosis; op) の劣性突然変異は、さまざまな臓器において破骨細胞、単球、およびマクロファージの著しい減少をもたらす (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1982. J. Exp. Med. 156:1516)。この減少は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 遺伝子のコード領域に存在する1塩

Recessive mutation of the cause gene (osteopetrosis; op) of the bone marble bone disease which exists in a 3rd chromosome, in various organs, they are the osteoclast and a monocyte, and a remarkable reduction of the macrophage It brings (Marks, S.C., Jr.). And P.W. Lane. 1976. J. Hered.67:11; Marks, S.C., Jr.1982.Am.J.Anat.163:157; Wiktor-Jedrzejczak, W.et al.1982.J.Exp.Med.156:1516. This reduction is insertion of one base pair which exists in the coding region of a

基対の挿入により、機能的なマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF または CSF-1) が欠損することが原因であり (Yoshida, H. et al. 1990. Nature (Lond.). 345:442)、組換えヒト M-CSF (rhM-CSF) の投与により補うことができる (Felix, R. et al. 1990. Endocrinology. 127:2592; Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:269; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1991. Exp. Hematol. 19:1049; Sundquist, K.T. et al. 1995. Bone. 16:39)。M-CSF が破骨細胞系列の細胞に直接作用することが、M-CSF の受容体である c-Fms を in vitro (Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:1291) および in vivo (Hofstetter, W. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9637) で破骨細胞に発現させる実験により実証されている。これらの結果は、M-CSF が生理的な条件下、ある種の臓器において、破骨細胞やマクロファージの分化に本質的な役割を果たしていることを示している。

macrophage colony stimulating factor (M-CSF) gene, it is because a functional macrophage colony stimulating factor (M-CSF or CSF-1) suffers deficit a loss (Yoshida, H. et al. 1990. Nature.(Lond.) 345:442), an administration of recombinant human M-CSF (rhM-CSF) It can supplement (Felix, R. et al. 1990. Endocrinology. 127:2592; Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:269; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1991. Exp. Hematol. 19:1049; Sundquist, K.T. et al. 1995. Bone. 16:39). That M-CSF acts on the cell of an osteoclast series directly C-Fms which is a receptor of M-CSF In vitro(Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:1291. The experiment which makes the osteoclast express in-vivo (Hofstetter, W. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9637) proves. In the organ of the source which are conditions with physiological M-CSF as for these results, having played the role essential to a differentiation of the osteoclast or the macrophage is shown.

## 【0003】

しかしながら op/op マウスにおいて、骨大理石病の深刻な症状が明確に現われるのは若いと

## [0003]

However, in an op/op mouse, it is restricted that the serious symptom of a bone marble bone disease appears clearly when young, while the



きに限られ、次第に破骨細胞が増加すると共に症状は改善されていく (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Begg, S.K. et al. 1993. J. Exp. Med. 177:237)。本発明者らは以前、rhM-CSF を高い用量 (5  $\mu$ g/マウス以上) で投与すると、単回投与でも op/op マウスの破骨細胞の形成 (recruitment) を誘導し、破骨細胞を生存させ、長期にわたる能動的骨吸収を維持させることを見出している (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873)。このことから、M-CSF 欠損下での破骨細胞の骨吸収に関わる他の因子の存在が示唆される。この点に関してはいくつかのデータが報告されているが、議論の余地が残されるものである。例えば、op/op マウスの骨大理石病の改善に、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が効果を持つという報告がある一方、in vitro で GM-CSF が破骨細胞の分化に関与することが示唆されている (MacDonald, B.R. et al. 1986. J. Bone Miner. Res. 1:227; Kurihara, N. et al. 1989. Blood. 74:1295; Takahashi, N. et al. 1991. J. Bone Miner. Res. 6:977)。osteoclast increases gradually The symptom improves (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Begg, S.K. et al. 1993. J. Exp. Med. 177:237). The present inventors will derive formation (recruitment) of the osteoclast of an op/op mouse also a single administration, if rhM-CSF is before administered by a high dosage (more than 5 microgram / mouse), it makes the osteoclast survive. Active bone resorption which it covers long-term It is discovering making it maintain (Kodama and H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873). From this, a presence of the other factor in connection with the bone resorption of the osteoclast under a M-CSF deficit is suggested. In this regard, it crawls and the data of shoes are reported. However, the room of an argument remains. While there is a report that a granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) has an effect in improvement of the bone marble bone disease of for example, an op/op mouse, in It is suggested that GM-CSF participates in differentiation of osteoclast by vitro (MacDonald, B.R. et al. 1986. J. Bone Miner. Res. 1:227; Kurihara, N. et al. 1989. Blood. 74:1295; Takahashi, N. et al. 1991. J. Bone Miner. Res. 6:977). Moreover Wiktor-Jedrzejczak et al. (Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1994. Endocrinology. 134:1932), Nilsson et al. (Nilsson)

6:977 ) 。 ま た 、 S.K. et al.1995.Blood.86:66, GM-CSF can  
Wiktor-Jedrzejczak ら improve a macrophage deficit.  
(Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. However, it has reported that it cannot be  
1994. Endocrinology. improved by the bone marrow bone disease.  
134:1932) および Nilsson ら These days came just and Myint and others  
(Nilsson, S.K. et al. 1995. (Myint, Y.Y. et al.1999.Am.J.Pathol.154.553)  
Blood. 86:66) は、GM-CSF は reported that GM-CSF and/or interleukin 3  
マクロファージ欠損を改善でき derived generating of the osteoclast of an op/op  
るが、骨大理石病は改善できな mouse in a low dose.  
いと報告している。つい最近に  
なり Myint ら (Myint, Y.Y. et al.  
1999. Am. J. Pathol. 154.553)  
は、GM-CSF および/またはイン  
ターロイキン3は低用量におい  
て op/op マウスの破骨細胞の発  
生を誘導することを報告した。

## 【0004】

c-Fms は、8種の血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) ファミリーの一つである (Kondo, K. et al. 1998. Gene. 208:297)。血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) に特異的な受容体としては、PDGFR に属する2つの受容体型チロシンキナーゼ、VEGFR-1 / Flt-1 および VEGFR-2 / KDR / Flk-1 と、neuropilin-1 とが同定されている (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J.13:9)。すべての VEGFR を発現する内皮細胞と違い、単球/マクロファージ系列の細胞は主に VEGFR-1 を発現する (Neufeld, G. et al. 1999.

## [0004]

C-Fms is one of eight sorts of the platelet-derived-growth-factor receptor (PDGFR) families (Kondo, K. et al.1998.Gene.208:297). As a receptor specific to a vascular endothelial growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF), two receptor type tyrosine kinase belonging to PDGFR, and VEGFR-1 / Flt-1 and VEGFR-2 / KDR/Flk-1, neuropilin-1 is identified (Neufeld, G. et al.1999.FASEB J.13:9). The endothelial cell and difference which express all the VEGFR(s), the cell of a monocyte / macrophage system row is mainly about VEGFR-1. It expresses (Neufeld, G. et). Al.1999.FASEB J.13:9; Berleon, B. et al.1996.Blood.87:3336; Clauss, M. et



FASEB J. 13:9; Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629 )。 VEGFR-1 は VEGF や胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) に対する走化性反応を媒介する (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9; Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629; Park, J.E. et al. 1994. J. Biol. Chem. 169:25646; Sawano, A. et al. 1996. Cell Growth Differ. 7:213; Hiratsuka, S. et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:9349)。 PIGF-1 は VEGF と高い相同性を有し、臍帯静脈の内皮細胞や胎盤で発現している。このような知見はあるものの、VEGF および PIGF-1、並びにそれらの受容体である VEGFR-1 と破骨細胞による骨吸収との関係は知られていなかった。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明らは、血管内皮増殖因子受容体 1 型を標的とした新規な破骨細胞の分化誘導系、該系を利用した破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物のスクリーニング方

[0005]

[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

This invention is the differentiation-inducing types of the new osteoclast which made the target the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, it makes into a subject to offer the medicine for adjusting the differentiation using this type of the osteoclast, survival and/or



法、並びに血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節するための薬剤を提供することを課題とする。

the screening procedure of a compound of adjusting the bone resorption and a differentiation of the osteoclast which made the target the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, survival, and/or the bone resorption.

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、マクロファージと破骨細胞は細胞系譜上、親密な関係があることから、マクロファージに対して作用するサイトカインである血管内皮増殖因子 (VEGF) が破骨細胞形成において効果を有するのではないかと考えた。そこで、M-CSF 遺伝子が欠損しており破骨細胞の形成に障害を持つ骨大理石病モデルマウス (op/op マウス) に VEGF を投与する実験を行った。その結果、VEGF は、破骨細胞による骨吸収において、op/op マウスの M-CSF 欠損を完全に相補できることを見出した。

## [0006]

## [MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]

On cell-lineage music, since the macrophage and the osteoclast had an intimate concern, they considered the present inventors that the vascular endothelial growth factor (VEGF) which is the cytokine which acts to the macrophage will have an effect in osteoclast formation.

Then, it conducted experiment which administers VEGF to the bone marble-bone-disease model mouse (op/op mouse) which the M-CSF gene is missing and has hindrance in formation of the osteoclast.

As a result, it sets VEGF to the bone resorption by the osteoclast, it discovered that it could carry out the complementation of the M-CSF deficit of an op/op mouse completely.

## 【0007】

組換え型ヒト VEGF (rhVEGF) を op/op マウスに1回投与することにより、破骨細胞が形成された。形成された破骨細胞は、主に VEGF 受容体1型 (VEGFR-1) を発現していた。VEGF の代わりに組換えヒト胎

## [0007]

The osteoclast was formed by administering the recombinant human VEGF (rhVEGF) once to an op/op mouse.

The formed osteoclast mainly expressed the VEGF receptor 1 type (VEGFR-1).

Since the osteoclast was formed by administering recombinant human placenta





盤増殖因子 1 型 (rhPIGF-1) を投与することによっても VEGF と同様に破骨細胞が形成されたことから、VEGF のシグナルは VEGFR-1 を介していることが示された。組換え型ヒト M-CSF で誘導した破骨細胞は、VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質の投与により VEGF を中和すると死んだが、引き続き組換え型ヒト M-CSF を投与することで生存させることができた。組換え型ヒト M-CSF によって支持された破骨細胞と内因性 VEGF によって支持された破骨細胞とは、骨吸収活性において殆ど差がなかった。op/op マウスは加齢と共に破骨細胞が増加し、骨大理石病が改善されてくる。このマウスに抗 VEGF 抗体を投与したところ、殆どの破骨細胞が消失したことから、op/op マウスの加齢に伴う骨大理石病の改善が内因的に産生される VEGF によるものであり、変異マウスで破骨細胞が生存 (appearance) するには、内因的に産生される VEGF が必要であることが示された。さらに、生体外 (in vitro) での破骨細胞分化の支持を調べた実験でも、VEGF は M-CSF の活性を代替できることが判明した。

【0008】

VEGF 投与によって形成された

proliferation-factor 1 type (rhPIGF-1) instead of VEGF as well as VEGF, it was shown that the signal of VEGF is through VEGFR-1.

The osteoclast derived by recombinant human M-CSF died, when the administration of VEGFR-1 / nature of Fc chimeric protein neutralized VEGF, but it was able to make it survive by administering recombinant human M-CSF succeedingly.

The osteoclast supported by recombinant human M-CSF and the osteoclast supported by endogenous VEGF did not almost have a difference in bone-resorption activity.

The osteoclast increases an op/op mouse with the aging, a bone marble bone disease is improved.

Since almost all osteoclast lost when the anti-VEGF antibody was administered to this mouse, improvement of the bone marble bone disease accompanying the aging of an op/op mouse is based on VEGF produced endogenously.

In order for the osteoclast to survive with a mutant mouse (appearance), it was shown that VEGF produced endogenously is required.

Furthermore, it became clear that VEGF could substitute for the activity of M-CSF also in the experiment which investigated support of the osteoclast differentiation by an external (in-vitro).

[0008]

When the detailed form of the osteoclast formed



破骨細胞の微細形態を観察したところ、波状縁 (ruffled boeder) および明帯 (clear zone) が認められ、ゴルジ装置および多数のミトコンドリアが観察されるなど、活発な破骨細胞の特色が示されていた。また、成熟破骨細胞を単離して、in vitro における M-CSF または VEGF による活性効果を調べたところ、VEGF の添加により破骨細胞の伸展現象が観察された。

**【0009】**

以上の結果から、M-CSF と VEGF は破骨細胞による骨吸収において、その機能が重複していることが実証された。どちらかのサイトカインが存在すれば、破骨細胞による骨吸収の全過程、すなわち破骨細胞の分化、破骨細胞の生存、および能動的骨吸収を支持するのに十分である。VEGF は M-CSF とは異なる受容体を介しており、異なるリガンド-受容体の組み合わせを使うユニークなタイプのサイトカインシグナルのリダンダンシーの存在が明らかとなった。

**【0010】**

VEGF や PIGF-1 などの VEGFR-1 のリガンドは VEGFR-1 を活性化し、破骨細胞を分化・形成させ、骨吸収を促進することが明らかとなった

of the VEGF administration is observed, a ruffled boeder) and a clear zone were noted, and the special feature of the active osteoclast was shown by such as observation of the Golgi apparatus and many mitochondria.

Moreover, when it isolated the mature osteoclast and investigated the active effect by M-CSF or VEGF in vitro, the extension phenomenon of the osteoclast by adding of VEGF was observed.

**[0009]**

As a result of the above, it was proved that M-CSF and VEGF have overlapped function in the bone resorption by the osteoclast.

It is enough to support all the processes of the bone resorption by the osteoclast, i.e., a differentiation of the osteoclast, survival of the osteoclast, and the active bone resorption if one of cytokine exists.

VEGF is through a different receptor from M-CSF, the presence of the redundancy of the cytokine signal unique type using the combination of a different ligand- receptor became clear.

**[0010]**

VEGF and the ligand of PIGF-1 etc. VEGFR-1 activate VEGFR-1, it specializes and forms the osteoclast.

Since it became clear to promote the bone resorption, the compound which activates



ことから、VEGFR-1 のリガンドなどの VEGFR-1 を活性化する化合物は、骨吸収活性が低下している骨大理石病を含む疾患の治療薬として用いることが可能となる。逆に、VEGFR-1 の活性化を抑制する薬剤は、破骨細胞の形成を阻害し、骨吸収を抑制する薬剤として用いることが可能である。このような薬剤は、M-CSF/c-Fms 系のシグナル伝達を抑制する薬剤と併用することでより高い効果を発揮し、破骨細胞の形成を阻害し、骨吸収を抑制すると考えられる。これにより、骨粗鬆症などの予防や治療を行なうことが可能である。

#### 【0011】

また、VEGFR-1 の活性化による破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を指標としたスクリーニング系は、骨吸収を調節するための薬剤のスクリーニング以外にも、VEGFR-1 を介する他の機能を制御する薬剤をスクリーニングするためにも使用することが考えられる。例えば、VEGFR-1 は発生時の脈管形成や成体における血管新生の促進、また血管内皮の透過性亢進に重要な機能を果たしている。従って VEGFR-1 の活性を促進する化合物は、傷害や梗塞などの疾病傷害により失われた

VEGFR-1, such as ligand of VEGFR-1, becomes possible to be used as therapeutic agent of the illness containing the bone marble bone disease to which bone-resorption activity is falling.

On the contrary, the medicine which controls activation of VEGFR-1 obstructs formation of the osteoclast, it can use as a medicine which controls the bone resorption.

Such a medicine demonstrates a higher effect by using together with the medicine which controls the signal transduction of a M-CSF/c-Fms type, it obstructs formation of the osteoclast, it is thought that it controls the bone resorption.

Thereby, it can perform prevention and the treatment of osteoporosis etc.

#### [0011]

Moreover, the screening system which made the parameter a differentiation of the osteoclast by activation of VEGFR-1, survival, and/or the bone resorption, it is possible to use it, also in order to screen the medicine which controls the other function which intervenes VEGFR-1 besides a screening of the medicine for adjusting the bone resorption.

For example, VEGFR-1 has achieved the function important for promotion of the angiogenesis in the vasculogenesis and adult creature at the time of generating, and a permeable enhancement of a vascular endothelium.

Therefore, the compound which promotes the activity of VEGFR-1 is useful as a medicine for



血管を新生させるための薬剤として有用である。また、腫瘍細胞においては、VEGF等のVEGFR-1リガンドの発現が亢進し、血管新生を誘導すると共に腫瘍を拡大させる。従って、VEGFR-1の活性化を抑制する薬剤は、血管誘導を抑制するため、制癌剤として有用である。このような血管誘導を促進または抑制する化合物を単離するために、骨細胞の形成や骨吸収を指標とする本発明のスクリーニング系を用いることが可能である。これら以外にも、上記のスクリーニング系はVEGFR-1を介するさまざまなシグナル伝達を調節する化合物を得るために適用することができる。すなわち、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を促進または抑制する化合物をスクリーニングする本発明の方法は、VEGFR-1を介するシグナル伝達を促進または抑制するための化合物を単離するために有用である。VEGFR-1は内皮細胞の増殖応答のシグナルを媒介するなど、生体内の様々な組織において細胞機能を制御していることが知られており、本発明のスクリーニング方法により単離され得る化合物は、VEGFR-1を介するこれらの機能を制御するために有用である。

making newly born the blood vessel lost by illness harms, such as a harm and infarction.

Moreover, the expression of VEGFR-1 ligand of VEGF etc. rises in oncocyte, it enlarges the tumor, while deriving angiogenesis.

Therefore, the medicine which controls activation of VEGFR-1 is useful as an anticancer agent in order to control a blood-vessel derivative.

In order to isolate the compound which promotes or controls such a blood-vessel derivative, it can use the screening system of this invention which makes formation and bone resorption of the bone cell a parameter.

Besides being these, the above-mentioned screening system is applicable in order to obtain the compound which adjusts various signal transductions through VEGFR-1.

That is, the procedure of this invention which screens the compound which promotes or controls a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption is useful in order to isolate the compound for promoting or controlling the signal transduction through VEGFR-1.

It is known that VEGFR-1 controls the cell function in various organizations in the living body, such as mediating the signal of a multiplication response of endothelial cell, and the compound which may be isolated by the screening procedure of this invention is useful to control these functions through VEGFR-1.

## 【0012】

本発明は、VEGFR-1 を介するシグナルによる破骨細胞の分化誘導系、該分化誘導系を利用した破骨細胞の分化や骨吸収を調節する化合物のスクリーニング、および VEGFR-1 を標的とした破骨細胞の分化や骨吸収を調節するための薬剤に関し、より具体的には、(1) 破骨細胞の分化を誘導する方法であって、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物の存在下で培養することを特徴とする方法、(2) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドである、(1) に記載の方法、(3) 血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型である、(2) に記載の方法、(4) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、(1) から(3) のいずれかに記載の方法、(5) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 該血管

## [0012]

This invention relates to the medicine for adjusting the differentiation and bone resorption of the osteoclast which made the target the screening of a compound which adjusts a differentiation and bone resorption of the osteoclast using the differentiation-inducing type of the osteoclast by the signal through VEGFR-1, and this differentiation-inducing type, and VEGFR-1, more specifically, (1) It is the procedure of deriving a differentiation of the osteoclast, comprised such that it cultures the cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in the presence of the compound which activates this vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

Procedure characterized by the above-mentioned, (2) Compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, procedure given in (1), (3) Ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, procedure given in (2), (4) Cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is unattachment property myeloid cells, procedure in any one of (1) to (3), (5) It is the procedure of screening the compound which promotes or obstructs a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption.

Comprising:

(a) Process which makes



内皮増殖因子受容体 1 型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型との結合を検出する工程、(c) 該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、(6) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、(7) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、(8) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、(6) または (7) に記載の方法、(9) 血管の誘導を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 血管内皮増殖

vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type in test compound presence, (b) Process which detects connection with this vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, this vascular endothelial growth factor, or placenta proliferation-factor 1 type, (c) Process which chooses compound which promotes or obstructs this connection, procedure containing these, (6) It is the procedure of screening the compound which promotes a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption.

Comprising:

(a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type contact test compound, (b) Differentiation of osteoclast, survival, and/or process that detects bone resorption, (c) This differentiation, survival, and/or process that chooses compound which promotes bone resorption, procedure containing these, (7) It is the procedure of screening the compound which obstructs a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption.

Comprising:

(a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in test compound presence contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, (b) Differentiation of osteoclast, survival, and/or process that detects bone resorption, (c) This differentiation, survival, and/or process that chooses compound which obstructs bone resorption,



殖因子受容体 1 型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、(10) 血管の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c) 該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、(9) または

(10) に記載の方法、(12) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進するための薬剤、(13) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドである、(12) に記載の薬剤、

(14) 血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型である、(13) に記載

procedure containing these, (8) Cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is unattachment property myeloid cells, (6) Or procedure given in (7), (9) It is the procedure of screening the compound which promotes a derivative of the blood vessel. Comprising:

(a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type contact test compound, (b) Differentiation of osteoclast, survival, and/or process that detects bone resorption, (c) This differentiation, survival, and/or process that chooses compound which promotes bone resorption, procedure containing these, (10) It is the procedure of screening the compound which obstructs a derivative of the blood vessel. Comprising:

(a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in test compound presence contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, (b) Differentiation of osteoclast, survival, and/or process that detects bone resorption, (c) This differentiation, survival, and/or process that chooses compound which obstructs bone resorption, procedure containing these, (11) Cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is unattachment property myeloid cells, (9) Or procedure given in (10), (12) Medicine for promoting differentiation of osteoclast, survival, and/or bone resorption which uses as active ingredient compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1

の薬剤、(15) 血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、(5) または (6) に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、(12) に記載の薬剤、(16) 大理石病、低回転型骨粗鬆症、および骨折からなる群より選択される疾患または傷害の治療のために用いられる、(12) から (15) のいずれかに記載の薬剤、(17) 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を阻害するための薬剤、(18) 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型と血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドとの結合を阻害する化合物である、(17) に記載の薬剤、(19) 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子に対する抗体である、(17) に記載の薬剤、(20) 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、(5) または (7) に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、(17) に記載の薬剤、(21) 高回転型骨粗鬆症、骨転移癌、骨肉腫、高カルシウム血症、および慢性関節リウマチにおける骨破壊から

type, (13) Compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, a medicine given in (12), (14) Ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, a medicine given in (13), (15) Compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type  
 (5) Or it is compound isolated by (6) by the screening procedure of statement, a medicine given in (12), (16) It is used for treatment of illness chosen from marble bone disease, low rotary osteoporosis, and group that consists of fracture, or harm, the medicine in any one of (12) to (15), (17) Medicine for obstructing differentiation of osteoclast, survival, and/or bone resorption which uses as active ingredient compound which obstructs vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type activation, (18) Compound which obstructs vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type activation is compound which obstructs connection with ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type and vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, a medicine given in (17), (19) Compound which obstructs vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type activation is antibody with respect to vascular endothelial growth factor, a medicine given in (17), (20) Compound which obstructs vascular-endothelial-growth-factor receptor 1





なる群より選択される疾患の治療のために用いられる、(17) から (20) のいずれかに記載の薬剤、(22) (9) に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、血管誘導促進剤、(23) (10) に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、制癌剤、に関する。

type activation

(5) Or it is compound isolated by (7) by the screening procedure of statement, a medicine given in (17), (21) It is used for treatment of illness chosen from high rotary osteoporosis, bone metastatic cancer, osteosarcoma, hypercalcemia, and group that consists of bone destruction in rheumatoid arthritis, it is related with the anticancer agent which uses as an active ingredient the blood-vessel derivative promoter which uses as an active ingredient the medicine in any one of (17) to (20), and the compound isolated by (22) and (9) by the procedure of a statement, and the compound isolated by (23) and (10) by the procedure of a statement.

【0013】

[0013]

#### 【発明の実施の形態】

##### 1. 破骨細胞の分化を誘導する方法

本発明者らは、血管内皮増殖因子 (VEGF) または胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) を利用して血管内皮増殖因子受容体 1 型 (VEGFR-1) を活性化させることにより破骨細胞を分化させ、骨吸収を促進させることができることを見出した。従って、本発明は、VEGFR-1 を標的として、これを活性化させることにより、該受容体を発現する細胞の破骨細胞への分化を誘導する方法を提供する。本発明の方法は、血管内皮増殖因子受容体 1

#### [EMBODIMENT OF THE INVENTION]

##### 1. How to derive differentiation of osteoclast

The present inventors makes the osteoclast specialize by utilizing vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) or placenta proliferation-factor 1 type (PIGF-1), and activating vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type (VEGFR-1).

It discovered that it could promote the bone resorption.

Therefore, this invention offers the procedure of deriving the differentiation to the osteoclast of the cell which expresses this receptor, by activating this by making VEGFR-1 into a target. The procedure of this invention is characterized by contacting the compound which makes the



型 (VEGFR-1) を発現する細胞に該血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物を接触させることを特徴とする。すなわち、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物の存在下で培養することにより実施することができる。培養は、例えば in vitro または in vivo で行うことができる。

**【0014】**

本発明の方法に用いる血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物としては、血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる能力を有する限り特に制限はないが、例えば、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが好適である。血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドとしては、血管内皮増殖因子 (VEGF)、および胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) が挙げられ、これらリガンドは本発明の方法に特に好適に用いることができる。また、これらの蛋白質の受容体結合部を含む断片、合成ペプチド、または合成化合物等であってもよい。

**【0015】**

cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type (VEGFR-1) activate this vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

That is, it can implement by culturing the cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in the presence of the compound which activates this vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

A culture, for example, can be performed by in-vitro or in-vivo.

**[0014]**

As long as it has the capability to activate vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, as a compound which activates the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type which it uses for the procedure of this invention, there is no limitation in particular, but the ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is suitable, for example.

As ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) and placenta proliferation-factor 1 type (PIGF-1) is mentioned, it can use the these ligand for the procedure of this invention especially suitably. Moreover, the fragment containing the receptor-binding part of these proteins, a synthetic peptide, or a synthetic compound may be sufficient.

**[0015]**



血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞としては、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現し、破骨細胞へ分化しうる細胞であれば特に制限はなく、例えば、非接着性骨髄細胞、脾臓細胞等が挙げられる。また、実施例 7 に示すように、既に破骨細胞に分化した細胞を、本発明の方法により活性化することもできる。細胞の培養は公知の方法に従って行えばよい。in vitro における培養は、例えば該化合物を含む培養液で細胞を培養することによって行えばよく、例えば非接着性骨髄細胞であれば実施例 4 に記載の方法により、また破骨細胞であれば例えば実施例 7 に記載の方法により行うことができる。

#### 【0016】

本発明の方法は in vivo において実施することもできる。in vivo における培養は、例えば該化合物を生体内へ投与することによって行うことができる。すなわち、血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物を生体に投与することにより、生体内で破骨細胞を分化・形成させることが可能である。あるいは、VEGF または PIGF-1 など

As cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, it expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, if it is the cell which can specialize to the osteoclast, there will be no limitation in particular, for example, unattachment property myeloid cells, the spleen cell, etc. will be mentioned.

Moreover, as shown in Example 7, the cell which already specialized in the osteoclast is also activable by the procedure of this invention.

What is sufficient is just to perform a culture of the cell according to the procedure of public knowledge.

In What is sufficient is just to perform culture in vitro by culturing cell by culture solution which contains this compound, for example.

For example, if it is unattachment property myeloid cells and is the osteoclast by the procedure of Example 4 again, it can carry out by the procedure of Example 7.

#### [0016]

The procedure of this invention It can also implement in in-vivo.

In It can perform the culture in vivo by administering this compound to in the living body, for example.

That is, it can specialize and form the in-vivo osteoclast by administering the compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type to a biological body.

Or it is sufficient to make the ligand express in a



の血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドを発現するベクターを投与することにより体内でリガンドを発現させてもよい。投与は全身投与でも局所投与でもよい。また、生体への投与は *ex vivo* により行うこともできる。すなわち、生体から骨髓細胞または脾臓細胞などの細胞を取りだし、血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物で処理したり、あるいは VEGF や PIGF-1 などの血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドを発現するベクターを導入し、この細胞を体内に戻すことで、破骨細胞の形成を促進することができる。*ex vivo* で血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドの遺伝子を導入する場合は、発現産物が破骨細胞に分化し得る細胞に到達し得る限り、該細胞以外の細胞に遺伝子を導することもできる。本発明の方法は、破骨細胞の形成を促進する既知の化合物と組み合わせ適用することもできる。このような化合物としては、例えば M-CSF/CSF-1 などが挙げられる。

#### 【0017】

#### 2. 破骨細胞の分化の促進剤または阻害剤のスクリーニング方法

本発明は、また、血管内皮増殖

body by administering the vector which expresses VEGF or the ligand with respect to PIGF-1 etc. vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

An administration can be either of local administration or systemic administration.

Moreover, administration to a biological body *ex vivo* can also perform.

That is, it takes out cell, such as myeloid cells or spleen cell, from a biological body, and processes with the compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, or it transduces the vector which expresses the ligand with respect to VEGF or PIGF-1 etc. vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, by reconstructing this cell to the inside of the body, it can promote formation of the osteoclast.

When transducing the gene of the ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type by *ex vivo*, as long as an expression production may reach the cell which can specialize in the osteoclast, it can also lead a gene into cell other than this cell.

The procedure of this invention is also applicable combining the known compound which promotes formation of the osteoclast.

As such a compound, M-CSF/CSF-1 etc. is mentioned, for example.

#### [0017]

#### 2. Promoter of differentiation of osteoclast, or screening procedure of inhibitor

This invention offers the screening procedure of the compound which promotes or obstructs a



因子受容体 1 型 (VEGFR-1) を標的とした、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法の一つの態様としては、血管内皮増殖因子受容体 1 型とそのリガンドとの結合を指標にした手法が挙げられる。このスクリーニングは、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、

(b) 該血管内皮増殖因子受容体 1 型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型との結合を検出する工程、および、(c) 該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

#### 【0018】

具体的には、例えば、精製した血管内皮増殖因子受容体 1 型 (VEGFR-1) を BIACORE (Pharmacia Biotech 社製) の金薄膜に結合させておき、精製したリガンド (VEGF または PIGF-1 など) と被験化合物を混合して薄膜に流し込み、レスポンスを測定する。スクリーニングに用いる被験化合物としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ラ

differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption which made the target the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type (VEGFR-1) again.

As one aspect of the screening procedure of this invention, the procedure of having made the parameter the connection with vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type and its ligand is mentioned.

This screening, (a) Process which makes vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type in test compound presence, (b) Process which detects connection with this vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, this vascular endothelial growth factor, or placenta proliferation-factor 1 type

It reaches, (c) Process which chooses compound which promotes or obstructs this connection, it can implement by the procedure containing these.

#### [0018]

Specifically, it combines the refined vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type (VEGFR-1) with the golden thin film of BIACORE (made by Pharmacia Biotech), for example, it mixes the refined ligand (VEGF or PIGF-1 etc.) and the refined test compound, pours into a thin film, and measures a response. Although it does not limit to these as a test compound which it uses for a screening, for example, a cell extract, the expression production of a gene library, a synthetic low molecular weight compound, a synthetic

イブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。スクリーニングに用いる被験化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。対照として被験化合物非存在下でも同様に測定する。具体的な操作は公知の文献に従えばよい（大野茂男・西村善文 監修，細胞工学 別冊 実験プロトコルシリーズ，タンパク実験プロトコル 1 機能解析編，第 10 章，pp. 164-179，秀潤社）。このスクリーニングにより、VEGFR-1 と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型との結合を促進または抑制する化合物を得ることができる。また、RIA として VEGFR-1 とラベルした精製リガンドおよび被験化合物を同一溶媒にて競争結合させ、その後抗 VEGFR-1 抗体で沈殿させ、その放射活性等を測定することによりスクリーニングすることも可能である。これにより、例えば VEGFR-1 に結合し、VEGFR-1 の活性化を抑制する化合物（VEGFR-1 のアンタゴニスト）を単離することもできる。

【0019】

peptide, a modification peptide, a natural compound, etc. are mentioned.

As required, it labels suitably the test compound which it uses for a screening, and it is used.

As a label, a radiation label, fluorescent labeling, etc. are mentioned, for example.

However, it does not limit to these.

It measures similarly in the test compound absence as a control.

The concrete operation should just follow the literature of public knowledge (Ono, Shigeo and Nishimura, Yoshifumi editorial supervision, cell technology separate volume experiment protocol series, a protein experiment protocol 1 performance-analysis edition, Chapter 10, pp.164-179, Shujunsha).

By this screening, it can obtain the compound which promotes or controls the connection with VEGFR-1, this vascular endothelial growth factor, or placenta proliferation-factor 1 type.

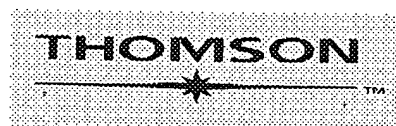
Moreover, it carries out the competition connection of the purification ligand and test compound which carried out the label to VEGFR-1 as RIA with the same solvent.

After that, it makes it precipitate by anti-VEGFR-1 antibody.

It can also screen by measuring the radioactivity etc.

This connects with VEGFR-1, for example, it can also isolate the compound (antagonist of VEGFR-1) which controls activation of VEGFR-1.

[0019]



本発明のスクリーニング方法の他の態様は、上記本発明の破骨細胞の分化誘導系を利用する方法である。該分化誘導系を利用した破骨細胞の分化を促進する化合物のスクリーニング方法は、(a) 血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b) 破骨細胞の分化を検出する工程、および、(c) 該分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

**【0020】**

スクリーニングに用いる被験化合物としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。また被験化合物として遺伝子を用いる場合には、その遺伝子を細胞に導入して発現させる。スクリーニングに用いる細胞としては、血管内皮増殖因子受容体1型を発現し、破骨細胞へ分化しうる細胞であれば特に制限はなく、例えば、非接着性骨髄細胞、脾臓細胞等が挙げられる。

**【0021】**

The other aspect of the screening procedure of this invention is the procedure of utilizing the differentiation-inducing type of the osteoclast of above-mentioned this invention.

The screening procedure of the compound which promotes the differentiation using this differentiation-inducing type of the osteoclast, (a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type contact test compound, (b) Process which detects differentiation of osteoclast

It reaches, (c) Process which chooses compound which promotes this differentiation, it can implement by the procedure containing these.

**[0020]**

Although it does not limit to these as a test compound which it uses for a screening, for example, a cell extract, the expression production of a gene library, a synthetic low molecular weight compound, a synthetic peptide, a modification peptide, a natural compound, etc. are mentioned.

Moreover, when using a gene as a test compound, it transduces the gene into the cell and makes it express.

As cell which it uses for a screening, it expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, if it is the cell which can specialize to the osteoclast, there will be no limitation in particular, for example, unattachment property myeloid cells, the spleen cell, etc. will be mentioned.

**[0021]**



具体的には、例えば、マウス骨髓細胞培養系に被験化合物を添加し、7～10日間培養した後、生成する破骨細胞数を測定する。被験化合物の添加により破骨細胞数が有意に増加するような化合物を選択する。被験化合物を添加する際に、VEGF および/または PIGF-1 を共存させておき、形成される破骨細胞数をより増加させる化合物を選択してもよい。

#### 【0022】

上記のスクリーニングにより得られる化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に直接作用してその機能を促進するもの、血管内皮増殖因子受容体1型に結合する分子に作用して間接的に該受容体の機能を促進するものなどが含まれる。化合物の作用点は様々な対照実験により検証することができる。例えば、血管内皮増殖因子受容体1型遺伝子の形質転換により該受容体を過剰発現する細胞と対照細胞に被験化合物を接触させ、対照細胞に比べ過剰発現細胞で破骨細胞の分化を有意に促進するかを検証することにより、この化合物が血管内皮増殖因子受容体1型の活性を促進しているかを判断することができる。また、実施例

Specifically, it adds a test compound to a mouse myeloid-cell culture system, for example, after cultivating for seven to ten days, it measures the number of osteoclast to form.

It chooses a compound which the number of osteoclast increases significantly by adding of a test compound.

When adding a test compound, it may make VEGF and/or PIGF-1 live together, and may choose the compound to which it makes the number of osteoclast formed increase more.

#### [0022]

It can consider what has various point of application as a compound obtained by the above-mentioned screening.

For example, what acts on vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type directly, and promotes its function, the thing which acts on the molecule which it connects with vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, and promotes the function of this receptor indirectly, etc. are contained.

The point of application of a compound is verifiable with various control experiment.

For example, it makes the cell which carries out the excess expression of this receptor by transforming of the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type gene, and the control cell contact a test compound.

By verifying whether compared with the control cell, it promotes a differentiation of the osteoclast significantly in the excess expression





に記載の VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質や可溶性 VEGFR-1 などの、血管内皮増殖因子受容体 1 型の細胞外ドメイン（またはリガンド結合ドメイン）を含む蛋白質の存在下で破骨細胞の分化の検出を同様に行い、この対照実験と比べ有意に破骨細胞への分化を促進する活性が高い化合物を選択すれば、血管内皮増殖因子受容体 1 型のリガンドとして作用する化合物を得ることができる。または、血管内皮増殖因子受容体 1 型遺伝子を欠損する細胞やキナーゼ活性を欠損する変異体を発現する細胞などを対照として同様の検出を行い、化合物の効果が抑制されるかを確認することもできる。このようにして、ある化合物が血管内皮増殖因子受容体 1 型を介する破骨細胞の分化を促進するかを判定することが可能である。また、スクリーニングを、M-CSF の受容体である c-Fms に対する抗体の存在下で行うか、あるいは c-Fms を変異させた細胞を用いて行い、M-CSF/c-Fms を介するシグナルを遮断しておくこともできる。

【0023】

cell, it can judge whether this compound is promoting vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type activity.

Moreover, VEGFR-1 / nature of Fc chimeric protein given in an Example, and soluble VEGFR-1 etc., it performs detection of a differentiation of the osteoclast similarly in the presence of a protein including a vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type extra-cellular magnetic domain (or ligand joint magnetic domain), if a compound with high activity which promotes the differentiation to the osteoclast significantly compared with this control experiment is chosen, it can obtain the compound which acts as vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type ligand.

Or it can also confirm whether the effect of a compound is inhibited by performing as a control similar detection in the cell which expresses the variant which suffers deficit a loss in the cell which suffers deficit a loss in the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type gene, or kinase activity.

Thus, it can judge whether a certain compound promotes the differentiation through vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type of the osteoclast.

Moreover, it performs a screening in the presence of the antibody with respect to c-Fms which is a receptor of M-CSF, or it can carry out using the cell to which it mutated c-Fms, and can also interrupt the signal through M-CSF/c-Fms.

[0023]



上記本発明の破骨細胞の分化誘導系を利用して破骨細胞の分化を阻害する化合物のスクリーニングを行なうことも可能である。このスクリーニングは、(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を検出する工程、および、(c) 該形成、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

#### 【0024】

具体的には、例えば、VEGF または PIGF-1 の存在下、マウス骨髓細胞培養系に被験化合物を添加し、7～10 日間培養した後、生成する破骨細胞数を測定する。添加により破骨細胞数が有意に減少するような化合物を選択する。

#### 【0025】

本発明のスクリーニングにおける、骨髓細胞の調製や破骨細胞の形成および／または生存の測定は、例えば以下のようにして行なうことができる。

<マウス骨髓細胞の調製> 6～12 週令のマウス (C3H/HeJ ; 日

It can also perform a screening of the compound which obstructs a differentiation of the osteoclast using the differentiation-inducing type of the osteoclast of above-mentioned this invention.

This screening, (a) Process which makes cell which expresses vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type in test compound presence contact vascular-endothelial-growth-factor or placenta proliferation-factor 1 type, (b) Process which detects formation of osteoclast, survival, and/or bone resorption

It reaches, (c) This formation, survival, and/or process that chooses compound which obstructs bone resorption, it can implement by the procedure containing these.

#### [0024]

Specifically, it adds a test compound to a mouse myeloid-cell culture system in the presence of VEGF or PIGF-1, for example, after cultivating for seven to ten days, it measures the number of osteoclast to form.

It chooses the compound that the number of osteoclast reduces significantly by adding.

#### [0025]

It can perform the manufacture of myeloid cells in a screening of this invention, formation of the osteoclast, and/or a measurement of survival as follows, for example.

<Manufacture of mouse myeloid cells>

The mouse of six to 12 weeks old (C3H/HeJ;)

It takes out the femur and tibia of a CLEA Japan



本クレア) の大腿骨及び脛骨を無菌的に取り出し、その骨端を切り落とし、両端から1回ずつ26Gの針を付けたシリンジで1mlの $\alpha$ -MEM培地(10%牛胎児血清、100単位/mlペニシリンG、100 $\mu$ g/mlストレプトマイシンを含む)で骨髓細胞を押し出し、良くピペティングした後骨残渣が沈殿するまで待ち、その上清を回収する。それを更に新鮮な培地で1~2回洗い、アッセイ用の骨髓細胞を調製する。

<破骨細胞分化形成法>上記の骨髓細胞を $10^{-8}$ Mの活性型ビタミンDに[1,25(OH) $_2$ D $_3$ ]を含む $\alpha$ -MEM培地中にけん濁させ、 $2 \times 10^6$ 個細胞/mlの濃度に調製し、96穴プレートに180 $\mu$ lと、被験試料溶液を20 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下、1または2週間培養する。その間、3~4日間隔で培地の3/4を新しい培地と交換し、新たに被験試料溶液を同量添加する。

<破骨細胞の同定法>破骨細胞のマーカー酵素であるTRAP(酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ)を基質で染色する。即ち上記の培養骨髓細胞をアセトン-クエン酸緩衝液で固定した後、酒石酸存在下で基質(Naphthol AS-MXphosphate)と色素(Fastredviolet LB salt)を37 $^{\circ}$ C

aseptically, it cuts off the osteoepiphysis and extrudes myeloid cells by a 1 ml (alpha)-MEM medium (fetus blood serum, the 100-unit/ml penicillin G, and 100 microgram/ml streptomycin are included 10%) by the syringe which attached the needle of 26G 1 time respectively from ends, it collects waiting and its supernatant until bone residue precipitates after improving a pipetting.

It prepares the myeloid cells for 1-2 times washing and an assay for it by a still fresher medium.

<The osteoclast differentiation forming method>

It suspends the above-mentioned myeloid cells in the (alpha)-MEM medium which contains [1, 25 (OH) $_2$ D $_3$ ] in the activated vitamin D of  $10^{-8}$  M.

It prepares to the density of  $2 \times 10^6$  pieces cell / ml, adding a test sample solution to a 96 wells plate 20 microliter with 180 microliter and it cultivates at 37 degrees C and 5% CO $_2$ , and for one or two weeks.

In the meantime, it exchanges three fourths of media for a new medium at intervals of 3-4 days, it newly adds the same amount a test sample solution.

<The identification method of the osteoclast>

A matrix dyes TRAP (tartaric acid resistance acid phosphatase) which is a marker enzyme of the osteoclast.

Namely, after fixing the above-mentioned culture myeloid cells with acetone- citrate buffer solution, it makes a matrix (Naphthol AS-MXphosphate) and the pigment (Fastredviolet LB salt) react at 37 degrees C by a tartaric acid presence for 1 hour.



で1時間反応させることにより It dyes (Takahashi, N.etal., Endocrinology, 122, 染色する (Takahashi, N. etal., and p1373 (1988)).  
Endocrinology, 122, p1373 (1988))。

**【0026】**

また、骨吸収の測定は、象牙を用いた pit 形成法を用いて、例えば以下のように行うことができる。象牙より直径 6mm、1mm 厚の象牙質スライスを作製し、それを 80%アルコール中で超音波処理することにより滅菌する。 $\alpha$ -MEM 培地で洗浄した後、各スライスを 96 ウェルプレート（ウェル底に移し、その上で上記「破骨細胞分化形成法」の方法に従って骨髄細胞から破骨細胞を分化誘導する。1または2週間後、象牙質スライス上の破骨細胞を上記 TRAP 染色法にて染色し、0.25%トリプシン-0.02%EDTA で一晩処理し、スライス上の細胞をシリコンスクレイパーで削り取る。象牙質スライス上の pit（吸収窩）を顕微鏡下で観察し、その数または pit あたりのメッシュ数を測定することにより骨髄細胞より分化誘導された細胞の骨吸収活性（骨分解活性）を調べることができる。

**[0026]**

Moreover, it can perform a measurement of the bone resorption as follows, using the pit forming method for having used ivory.

It produces diameter 6 mm and a 1 mm-thickness dentine slice from ivory, it sterilizes by carrying out the ultrasonication of it in 80% alcohol.

After cleaning by a (alpha)-MEM medium, it moves each slice to the well bottom of 96 well plate, according to the procedure of the above "osteoclast differentiation forming method", it carries out that it is differentiation-inducing of the osteoclast from myeloid cells on it.

It dyes the osteoclast on a dentine slice with the above-mentioned TRAP staining in 1 or two weeks, it processes by 0.25% trypsin- 0.02% EDTA overnight, it shaves off the cell on a slice by a silicone scraper.

It observes pit on a dentine slice (absorption cavity) under a microscope, it can investigate the bone-resorption activity (bone degradation activity) of the cell by which it was carried out from myeloid cells that it is differentiation-inducing by measuring the number or the number of meshes per pit.

**【0027】**

上記本発明のスクリーニング系は、破骨細胞の分化誘導を行う

**[0027]**

The screening system of above-mentioned this invention is useful in order to isolate the



薬剤のスクリーニングに限定されず、血管内皮増殖因子受容体1型を介する様々なシグナル伝達を促進または抑制する化合物を単離するために有用である。例えば、本発明のスクリーニング系を、血管誘導を促進または抑制する薬剤のスクリーニングに用いることが可能である。血管内皮増殖因子受容体1型は血管新生に関与しているため、この活性を調節する化合物は血管誘導を制御するための薬剤として利用することができる。血管誘導活性を直接アッセイすることは煩雑であるので、本発明の破骨細胞誘導系を用いることで、より簡便にスクリーニングを行うことができる。実際のスクリーニングは、上記に述べた破骨細胞の形成、生存、および/または骨吸収を促進または阻害する化合物のスクリーニングと同様に行えばよい。このスクリーニングにより得られる血管誘導促進剤は、例えば心筋梗塞や脳梗塞などの疾病により失われた血管を再生させるための薬剤として有用である。逆に血管誘導抑制剤は制癌剤として有用である。対象となる癌としては、すべての固形腫瘍が挙げられる。

【0028】

compound which promotes or controls various signal transductions which are not limited to the screening of a medicine which performs the differentiation induction of the osteoclast, but intervene vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

For example, it can use the screening system of this invention for a screening of the medicine which promotes or controls a blood-vessel derivative.

Since the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is participating in angiogenesis, it can utilize the compound which adjusts this activity as a medicine for controlling a blood-vessel derivative.

It is complicated to assay a blood-vessel induction activity directly.

Therefore, by using the osteoclast derivative type of this invention, it can perform a screening more easily.

The actual screening should just perform formation of the osteoclast described above, survival, and/or the bone resorption like a screening of the compound which it promotes or obstructs.

The blood-vessel derivative promoter obtained by this screening is useful as a medicine for reproducing the blood vessel lost, for example by illnesses, such as myocardial infarction and cerebral infarction.

Conversely, the blood-vessel derivative inhibitor is useful as an anticancer agent.

All the solid tumor is mentioned as target cancer.

[0028]



### 3. 破骨細胞の分化の促進剤または阻害剤

#### (1) 促進剤

本発明において、血管内皮増殖因子 (VEGF) を op/op マウスに投与することにより、破骨細胞が形成され、また、VEGF の代わりに胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) を投与することによっても VEGF と同様に破骨細胞が形成された。すなわち、VEGF のシグナルは血管内皮増殖因子受容体 1 型を介していることが示された。この事実、血管内皮増殖因子受容体 1 型を標的とする化合物が、破骨細胞の形成・生存、さらには骨吸収を調節する薬剤となることを示している。

#### 【0029】

すなわち本発明は、血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を促進するための薬剤に関する。薬剤の有効成分となる血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物には、例えば、血管内皮増殖因子受容体 1 型に結合し活性化するもの (受容体のアゴニスト) の他、血管内皮増殖因子受容体 1 型とそのリガンドとの結合を促進する化合物などが含まれる。好適な化合物としては、例えば、

### 3. Promoter or inhibitor of differentiation of , osteoclast

#### (1) Promoter

In this invention, the osteoclast is formed by administering a vascular endothelial growth factor (VEGF) to an op/op mouse, moreover, the osteoclast was formed by administering placenta proliferation-factor 1 type (PIGF-1) instead of VEGF as well as VEGF.

That is, it was shown that the signal of VEGF is through vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

This fact shows that the compound which makes a target vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type serves as formation and survival of the osteoclast, and a medicine which adjusts the bone resorption further.

#### [0029]

That is, this invention relates to the medicine for promoting formation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption which uses as an active ingredient the compound which activates vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type.

In the compound which activates the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type used as the active ingredient of a medicine, for example, besides what is connected with vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type and is activated (agonist of a receptor), the compound which promotes the connection of vascular-endothelial-growth-factor receptor 1

血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが挙げられる。血管内皮増殖因子受容体 1 型のリガンドとしては、血管内皮増殖因子 (VEGF) および胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) が知られている。また、上記のスクリーニングにより得られる化合物を用いてもよい。このような化合物は、*in vivo*、*ex vivo*、または *in vitro* で、破骨細胞の形成を誘導し、また、その生存を維持するための薬剤として用いられる。また、生体に投与して骨吸収の促進のために用いることもできる。血管内皮増殖因子 (VEGF) や胎盤増殖因子 1 型 (PIGF-1) などのタンパク質を投与する場合には、これら蛋白質を直接または *ex vivo* で投与する以外に、これらの蛋白質をコードする核酸を用いた遺伝子治療なども考えられる。治療の対象となる疾患としては、骨大理石病や低回転型骨粗鬆症などが挙げられ、また、骨折治癒促進のために使用することも可能である。

## 【0030】

## (2) 阻害剤

また、本発明は血管内皮増殖因子受容体 1 型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の形成、生存、および／

type and its ligand, is contained.

As a suitable compound, the ligand with respect to vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type is mentioned, for example.

As vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type ligand, the vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) and placenta proliferation-factor 1 type (PIGF-1) is known.

Moreover, it is sufficient to use the compound obtained by the above-mentioned screening.

Such a compound is *in-vivo*, *ex vivo*, or *in-vitro*, and it derives formation of the osteoclast, moreover, it is used as a medicine for maintaining the survival.

Moreover, it can administer to a biological body and can also use for promotion of the bone resorption.

In the case where it administers protein, such as a vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta proliferation-factor 1 type (PIGF-1), besides direct or *ex vivo* administration of these protein, the gene therapy using the nucleic acid which codes these proteins, etc. is considered.

As illness which is the target of a treatment, a bone marble bone disease, low rotary osteoporosis, etc. are mentioned, moreover, it can also use it for fracture healed promotion.

## [0030]

## (2) Inhibitor

Moreover, this invention relates to the medicine for obstructing formation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption which uses as an active ingredient the compound which



または骨吸収を阻害するための薬剤に関する。このような化合物には、例えば、血管内皮増殖因子受容体 1 型に結合してその活性化を阻害するもの（受容体のアンタゴニスト）や血管内皮増殖因子受容体 1 型とそのリガンドとの結合を阻害するものなどが含まれる。実施例に示したように、血管内皮増殖因子受容体 1 型のリガンドに対する抗体の投与は、該リガンドと血管内皮増殖因子受容体 1 型との結合を阻害し、破骨細胞数を減少させた（実施例 5）。このように、血管内皮増殖因子受容体 1 型またはそのリガンドに対する抗体は、破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を阻害するための本発明の薬剤として有用である。抗体治療に用いる場合は、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。また、血管内皮増殖因子受容体 1 型と Fc とのキメラ蛋白質など、可溶型に改変した血管内皮増殖因子受容体 1 型蛋白質の投与は、リガンドを中和する効果を示す（実施例 3）。可溶型の受容体は天然にも存在する。このような蛋白質も本発明の薬剤に好適に用いられる。また、上記のスクリーニングにより得られる化合物を用いてもよい。

obstructs vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type activation.

What connects with vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, and obstructs the activation, for example (antagonist of a receptor), the thing which obstructs the connection with vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type and its ligand, etc. are contained in such a compound.

As shown in the Example, an administration of the antibody with respect to the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type ligand obstructs the connection of this ligand and vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type, (Example 5) which decreased the number of osteoclast.

Thus, the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type or the antibody with respect to the ligand is useful as a medicine of this invention for obstructing formation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption. When using for an antibody therapy, it is desirable that they are a human-type antibody or a human antibody.

Moreover, an administration of the vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type protein changed to soluble types, such as nature of chimeric protein of vascular-endothelial-growth-factor receptor 1 type and Fc, is (Example 3) which shows the effect which neutralizes the ligand.

Also naturally, a soluble type receptor exists.

Such a protein is also used suitably for the medicine of this invention.

Moreover, it is sufficient to use the compound





obtained by the above-mentioned screening.

**【0031】**

このような化合物は、in vivo、ex vivo、またはin vitro で、破骨細胞の形成および／または生存を抑制するための薬剤として用いられ、また、生体に投与すれば骨吸収を抑制することができる。治療の対象となる疾患としては、骨転移癌、骨肉腫、高回転型骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチにおける骨破壊などが挙げられる。

**[0031]**

Such a compound is in-vivo, ex vivo, or in-vitro, and is used as a medicine for controlling formation and/or survival of the osteoclast, moreover, if it administers to a biological body, it can control the bone resorption.

As illness which is the target of a treatment, the bone destruction in a bone metastatic cancer, an osteosarcoma, high rotary osteoporosis, the hypercalcemia, and a rheumatoid arthritis etc. is mentioned.

**【0032】**

**(3) 製剤化**

破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物や血管誘導を調節する化合物は、in vitro または in vivo 等における骨吸収の調節剤（促進剤または抑制剤）、または血管誘導の調節剤（促進剤または抑制剤）などの薬剤として有用である。本発明の薬剤は試験研究等における試薬として、また各種疾患の予防または治療のための医薬として利用され得る。本発明の薬剤は、他の溶質または溶媒と共に組成物とすることもできる。破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物や血管誘導を調節する化合物等を医薬として用いる場合には、化合物自体を直接患者に

**[0032]**

**(3) Formulating**

The compound which adjusts a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption, and the compound which adjusts a blood-vessel derivative is useful as medicines, such as regulator (a promoter or an inhibitor) of the bone resorption in in-vitro or in-vivo etc., or regulator (a promoter or an inhibitor) of a blood-vessel derivative.

The medicine of this invention may be utilized as the test in test research etc., and a pharmaceutical for prevention of various illness, or a treatment.

It can also use the medicine of this invention as a composition with the other solute or the solvent.

When using as a pharmaceutical the compound which adjusts a differentiation of the osteoclast, survival, and/or the bone resorption, the compound which adjusts a blood-vessel

投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、皮肉的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。インピボ法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。投与量は、治療の目的、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状、有効成分の活性などの諸要因により

derivative, etc., besides administering the compound itself to a patient directly, it can formulate by the pharmacological procedure of public knowledge, and can also perform an administration.

For example, it is possible a pharmacologically acceptable support or a medium, and to formulate in combination as appropriate specifically with a sterilized water, the physiological saline, a vegetable oil, an emulsifier, a suspension agent, a surface active agent, a stabilizer, etc., and to administer.

The administration to a patient can be performed by, for example, the procedure well-known to those skilled in intranasal, bronchial, mesothelial, muscle, or oral way, as well as the injection in an artery, an intravenous injection, a hypodermic injection, etc.

When administering by the in vivo method, generally it is considered as the injection etc., it is sufficient to add an as required usual holder.

Moreover, when it is made the form of a liposome or membrane-fusion liposomes (Sendai-virus (HVJ)-liposome etc.), it can consider it as liposome tablets, such as a suspension agent, cryogen, and centrifugation concentration cryogen.

It fluctuates a dosage by the objective of a treatment, a patient's body weight, age, the administration procedure, etc.

However, if it is those skilled in the art, it can choose a suitable dosage suitably.

Moreover, if this compound is coded by DNA and it gets, performing built-in and gene therapy to the vector for gene therapies will also be considered in this DNA.



変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。投与量は、通常は 0.0001～100mg、好ましくは 0.001～10mg の範囲内であると考えられる。

It fluctuates a dosage and the administration procedure according to a patient's body weight, age, the symptom, and many of which active factors of an active ingredient.

However, if it is those skilled in the art, it can choose suitably.

A dosage is usually 0.0001 - 100 mg, it is thought that it is preferably within the range of 0.001 - 10 mg.

### 【0033】

### [0033]

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### [EXAMPLES]

Hereafter, an Example demonstrates this invention concretely.

This invention is not limited to a these Example.

#### 【実施例 1】

破骨細胞形成に及ぼす VEGF の効果

M-CSF/CSF-1 の活性を喪失した osteopetrotic (op/op) マウスにおいて、機能的 M-CSF の欠損を VEGF が相補し、破骨細胞の形成を支持することができるかを調べるため、まず、rhM-CSF、rhVEGF165、rhVEGF121、または rhPIGF-1 を 12 日齢の op/op マウスへ投与する実験を行った。op/op マウスとその同腹正常個体 (+/?) は以前記載したように作製した (Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:269; Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner.

#### [EXAMPLE 1]

The effect of VEGF which it exerts on osteoclast formation

Osteopetrotic which lost the activity of M-CSF/CSF-1 In a mouse (op/op), VEGF carries out the complementation of the deficit of functional M-CSF, in order to investigate whether it can support formation of the osteoclast, it conducted first experiment which administers rhM-CSF, rhVEGF165, rhVEGF121, or rhPIGF-1 to a 12 day-old op/op mouse.

It indicated an op/op mouse and its belly normal solid (+/?) of this before.

It produced (Kodama and H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:269; Kodama and H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45).

Whether a mouse is an op/op inheritance type



Res. 8:45)。マウスが op/op 遺伝型であるかは、11 日齢で切歯萌出がないことにより同定した。サイトカインおよび/または抗体の op/op マウスへの投与を以下のように行った。5  $\mu$ g の rhM-CSF (Austral Biologicals, San Ramon, CA)、rhVEGF165 (Genzyme, Cambridge, MA)、rhVEGF121 (Genzyme)、または rhPIGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) は、12 日齢の op/op マウスに腹腔内投与し、投与後 3 日目に屠殺した。AFS98 ラット抗マウス c-Fms モノクローナル抗体 (Sudo, T. et al. 1995.Oncogene. 11:2469) を投与する場合は、サイトカイン投与の 2 時間前、およびサイトカイン投与の 24 時間後の 2 回、変異マウスの腹腔内へ 750  $\mu$ g/マウスの用量で投与し、サイトカイン投与後 3 日に屠殺した。屠殺から破骨細胞の計数までは以下のように行った。op/op マウスをエーテルで麻酔し、4%ペリオデート-リジン-パラホルムアルデヒド固定液 (pH7.4) を下行大動脈から灌流させた。大腿骨は 10% EDTA (pH7.0) 中で 10 日間脱カルシウムを行い、パラフィンに包埋した。大腿骨全体を含む試料の中央部の縦断切片 (7  $\mu$ m 厚) を作製し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活

identified, when there was no incisor eruption at 11 day-old. It performed the administration to cytokine and/or the op/op mouse of an antibody as follows. RhM-CSF of 5 microgram (Austral Biologicals, San Ramon, CA), it intraperitoneally administers rhVEGF165 (Genzyme, Cambridge, MA), rhVEGF121 (Genzyme), or rhPIGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) to a 12 day-old op/op mouse, it killed to the third day after administration. When administering an AFS98 rat anti- mouse c-Fms monoclonal antibody (Sudo, T. et al.1995.Oncogene.11:2469), it administers by the dosage of 750 microgram / mouse to the intraperitoneal of a mutant mouse twice 24 hours 2 hours before a cytokine administration and after a cytokine administration, it killed on the 3rd after a cytokine administration. It performed the count of the osteoclast as follows from the killing. It anesthetizes an op/op mouse with ether, it perfused the peliodate lysine-paraformaldehyde fixative (pH7.4) from the descending aorta 4%. The femur performed the decalcification in ten days in EDTA (pH7.0) 10%, and embeded it with the paraffin. It produces the vertical section cut piece (7 micrometerthickness) of the center section of the sample containing the whole femur, it indicated dyeing by tartaric acid resistance acid-phosphatase (TRAP) activity. It performed counter dyeing by a deed (Kodama and H. et al.1993.J.Bone Miner.Res.8:45; Niida,



性による染色を以前記載したように行い (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873)、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。2 個以上の核を持つ TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計数した。3 個体のマウスから得た 6 切片を計数し、平均±標準偏差を求めた。いくつかの切片はマロリー (Mallory) のアザン染色を行った。

#### 【0034】

表 1 に示すように、上記の因子のいずれか 5  $\mu$ g の 1 回の投与は、変異マウスにおける破骨細胞の形成には十分であったが、rhVEGF (rhVEGF165 および rhVEGF121) や rhPIGF-1 による形成は rhM-CSF によるものに比べ 60~70% であった。アンタゴニストとして作用する抗 c-Fms モノクローナル抗体、AFS98 (Sudo, T. et al. 1995. Oncogene. 11:2469) は、rhM-CSF による破骨細胞の形成を約 25% にまで減少させたが、rhVEGF や rhPIGF-1 による形成は減少させなかった。このことから、c-Fms は、破骨細胞前駆細胞の M-CSF への応答を媒介しているが、VEGF や PIGF-1 への応答は媒介していないことが確認された。

S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873) and the hematoxylin.

It counted the TRAP positive cell with a 2. or more nucleus as osteoclast.

It counts six cut pieces obtained from the mouse of three solids, it required for the average +/- standard deviation.

Some cut pieces performed Azan dyeing of Mallory (Mallory).

#### [0034]

As shown in Table 1, it is either of the above-mentioned factors. One administration of 5 microgram was enough for formation of the osteoclast in a mutant mouse.

However, the formation by rhVEGF (rhVEGF165 and rhVEGF121) or rhPIGF-1 was 60 to 70% compared with what depends on rhM-CSF.

The anti- c-Fms monoclonal antibody and AFS98 which act as an antagonist (Sudo, T. et al. 1995. Oncogene. 11:2469) decreased formation of the osteoclast by rhM-CSF even to about 25%.

However, it did not decrease the formation by rhVEGF or rhPIGF-1.

From this, c-Fms carries the response to M-CSF of an osteoclast progenitor cell.

However, not carrying the response to VEGF or PIGF-1 was confirmed.



【0035】

[0035]

【表1】

[TABLE 1]

op/op マウスにおける RhM-CSF in an op/op mouse, rhVEGF, and  
rhM-CSF、rhVEGF、および osteoclast formation ability of rhPIGF-1  
rhPIGF-1 の破骨細胞形成能

サイトカイン	AFS98	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	-	3±2
rhM-CSF	-	60±6
rhM-CSF	+	14±9
rhVEGF165	-	42±1
rhVEGF165	+	43±7
rhVEGF121	-	37±4
rhPIGF-1	-	37±2
rhPIGF-1	+	35±2

Cytokine

Osteoclast/cut piece (average ± S.D.)

なし: None

【0036】

[0036]

【実施例2】 VEGFR の免疫組

[Example 2]

織化学染色

Immune-tissue chemistry dyeing of VEGFR

2～3 週齢の+/?マウスまたは  
op/op マウスの大腿骨を実施例

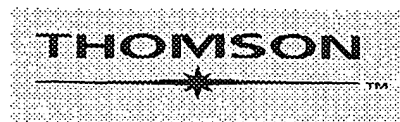
It fixes the femur of a 2 to 3 week-old +/?  
mouse, or an op/op mouse like Example 1, it  
embeds from the paraffin.

1と同様にして固定し、パラフ  
インで包埋した。大腿骨の切片  
(5μm 厚)をウサギ抗マウス

The cut piece (5 micrometer thickness) of a  
femur

VEGFR-1 ポリクローナル抗体  
(Santa Cruz Biotechnology)ま  
たは AVAS12 ラット抗マウス

Rabbit anti- mouse VEGFR-1 polyclonal  
antibody (Santa Cruz Biotechnology) or  
AVAS12 rat anti- mouse VEGFR-2 monoclonal



VEGFR-2 モノクローナル抗体 (Kataoka, H. et al. 1997. Develop. Growth Differ. 39:729) で免疫組織化学染色を行った。Vectastain elite ABC キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用い、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。正常ウサギ IgG (Santa Cruz Biotechnology) およびラット IgG2a (Santa Cruz Biotechnology) をそれぞれポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の対照として用いた。

antibody (Kataoka, H. et al.) 1997. It performed immune-tissue chemistry dyeing by Develop. Growth Differ. 39:729. Vectastain elite ABC It performed counter dyeing by the hematoxylin using the kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) and rat IgG2a (Santa Cruz Biotechnology) were used as a control of a polyclonal antibody and a monoclonal antibody, respectively.

## 【0037】

図1A に示したように、破骨細胞はウサギ抗マウス VEGFR-1 ポリクローナル抗体により強く染色されたが、内皮細胞は VEGFR-1 に弱く陽性であった。一方、破骨細胞は AVAS12 抗マウス VEGFR-2 モノクローナル抗体 (Kataoka, H. et al. 1997. Develop. Growth Differ. 39:729) では染色されなかったが、内皮細胞は VEGFR-2 染色に関して陽性であった (図1B)。正常ウサギ IgG (図1C) およびラット IgG2a ではどちらの細胞種も染色されなかった。rhM-CSF で誘導された op/op マウスの破骨細胞も上記と同様の染色パターンを示した。これらの結果から、破骨細胞は、単球

## [0037]

As shown in FIG. 1A, the osteoclast was strongly dyed by the rabbit anti- mouse VEGFR-1 polyclonal antibody. However, endothelial cell was weakly positive to VEGFR-1. On the other hand, the osteoclast was not dyed by AVAS12 anti- mouse VEGFR-2 monoclonal antibody (Kataoka, H. et al. 1997. Develop. Growth Differ. 39:729). However, endothelial cell was positive about VEGFR-2 dyeing (FIG. 1B). Neither of the cell sources was dyed in the normal rabbit IgG (FIG. 1C) and rat IgG2a. The dyeing pattern also with osteoclast of the op/op mouse derived by rhM-CSF similar to the above was shown. These results proved that the osteoclast mainly expressed VEGFR-1 similar to the cell of a monocyte / macrophage system row. (Berleon,



／マクロファージ系列の細胞と同様、主に VEGFR-1 を発現していることが実証された (Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629)。VEGF121 は neuropilin-1 とは結合しない (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9)。PIGF-1 は VEGFR-1 に結合するが、VEGFR-2 や neuropilin-1 とは結合しない (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9; Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629; Park, J.E. et al. 1994. J. Biol. Chem. 169:25646; Sawano, A. et al. 1996. Cell Growth Differ. 7:213)。破骨細胞形成の支持に関して、rhVEGF121 および rhPIGF-1 が共に rhVEGF165 と同等の活性を示した (表 1) ことから、破骨細胞の前駆細胞の VEGF に対する応答が VEGFR-1 を介していることが確かめられた。

B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629). VEGF121 It does not connect with neuropilin-1 (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9). It connects PIGF-1 with VEGFR-1. However It does not connect with VEGFR-2 or neuropilin-1 (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9; Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629; Park, J.E. et al. 1994. J. Biol. Chem. 169:25646; Sawano, A. et al. 1996. Cell Growth Differ. 7:213). It is related with support of osteoclast formation. Table 1 Since rhVEGF121 and rhPIGF-1 showed activity equivalent to both rhVEGF165, it was confirmed that the response with respect to VEGF of the progenitor cell of the osteoclast is through VEGFR-1.

## 【0038】

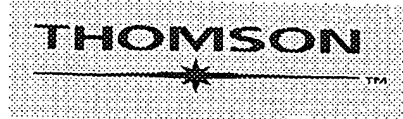
[実施例 3] 破骨細胞の形成および生存における VEGF の中和の影響  
次に本発明者らは、op/op マウスに VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質を投与することによって、内因

## [0038]

## [Example 3]

Influence of neutralization of VEGF in formation and survival of the osteoclast  
Next, the present inventors neutralizes VEGF produced endogenously by administering VEGFR-1 / nature of Fc chimeric protein to an





的に産生される VEGF を中和し、VEGF および M-CSF が成熟破骨細胞の生存を支持する能力に関して調べた。まず 12 日齢 op/op マウスに rhM-CSF を 1 回投与する前処理を行った。この前処理の 4 日後から、5  $\mu$ g の VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質 (R&D Systems) および/または rhM-CSF を 12 時間おきに 6 回、腹腔内投与した。前処理後 7 日のマウスを屠殺した。キメラ蛋白質の対照として、5  $\mu$ g のヒト IgG (ICN Pharmaceuticals, Aurora, OH) を上記と同様に投与した。大腿骨全体の中央部の縦断切片における破骨細胞数を計数した。結果は、3 個体のマウスから得た 6 切片の平均  $\pm$  標準偏差で表した (表 2)。

#### 【0039】

本発明者らが以前報告 (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873) したように、rhM-CSF を 1 回投与後、3 日で破骨細胞数はプラトーに達し、7 日目まで維持された (表 1 および 2)。4~6 日目に 12 時間おきにキメラ蛋白質を連続的に投与すると、破骨細胞は約 25% に減少した。ヒト IgG1 の投与で

op/op mouse, VEGF and M-CSF investigated about the capability to support survival of the mature osteoclast.

It performed the pretreatment which administers rhM-CSF once to the 12-day-old op/op mouse first.

Four days after this pretreatment, it intraperitoneally administered VEGFR-1 / nature of Fc chimeric protein (R&D Systems), and/or rhM-CSF of 5 microgram 6 times every 12 hours.

It killed the mouse on after-pretreatment the 7th. As a control of nature of chimeric protein, it administered the human IgG (ICN Pharmaceuticals, Aurora, OH) of 5 microgram in the same manner to the above.

It counted the number of osteoclast in the vertical section cut piece of the center section of the whole femur.

It expressed the result with the average  $\pm$  standard deviation of six cut pieces obtained from the mouse of three solids (Table 2).

#### [0039]

As previously reported by the present inventors (Kodama and H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873), the number of osteoclast will arrive at the plateau after administration once in rhM-CSF in three days, it maintained till the 7th (Tables 1 and 2).

When nature of chimeric protein was 4-6 day administered continuously every 12 hours, the osteoclast reduced to about 25%.

The variation of the number of osteoclast did not take place in an administration of human



は破骨細胞数の変化は起こらなかった (表 2)。それに対して、rhM-CSF を VEGFR-1/Fc と共に投与したところ、破骨細胞数は rhM-CSF のみを連続して投与したときと同様のレベルまで増加した。これらの結果は、rhM-CSF の単回投与後に形成される破骨細胞は、op/op マウスで内因的に産生される VEGF により支持されていることを示すと共に、M-CSF は成熟破骨細胞の生存を VEGF の助けなしに支持できることを示している。

IgG1 (Table 2). When rhM-CSF was administered with VEGFR-1/Fc to it, the number of osteoclast increased to the level similar to, when only rhM-CSF was administered continuously. While it is shown that the osteoclast in which these results are formed after the single administration of rhM-CSF is supported by VEGF endogenously produced with an op/op mouse, it is shown that M-CSF can support survival of the mature osteoclast without the assistance of VEGF.

【0040】

[0040]

【表 2】

rhM-CSF で形成した op/op マウスの破骨細胞の生存に及ぼす VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質投与の効果

[TABLE 2]

The effect of VEGFR-1 / nature administration of Fc chimeric protein which it exerts on survival of the osteoclast of the op/op mouse formed by rhM-CSF

処理	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	59±9
VEGFR-1/Fc	15±5
ヒトIgG1	65±9
VEGFR-1/FcおよびrhM-CSF	87±9
rhM-CSF	81±8

Process

Osteoclast/cut piece (average ± S.D.)

なし: None

ヒト: Human



および: And

**【0041】**

本発明者らはさらに、1回の rhM-CSF 投与のみを受けた op/op マウス、または1回の rhM-CSF 投与に加え、 VEGFR-1/Fc および rhM-CSF の連続投与を受けた op/op マウスの大腿骨の骨吸収を調べた。前者の群のマウスの破骨細胞は内因性の VEGF の支持を受けて機能することができるが、後者の群は外来性の rhM-CSF に頼ることになる。

**[0041]**

In addition to the op/op mouse which received only one rhM-CSF administration, or one rhM-CSF administration, the present inventors investigated further the bone resorption of the femur of the op/op mouse which received the continuous medication of VEGFR-1/Fc, and rhM-CSF.

The osteoclast of the mouse of the former group can function gaining support of endogenous VEGF.

However, it depends for the latter group on foreign rhM-CSF.

**【0042】**

以前の報告通り (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45)、rhM-CSF を1回投与後7日目には、大腿骨において大量の骨小柱 (bone trabeculae) の吸収と骨髓への置換が認められた (図2Aおよび2B)。後者の群のマウスにおいても、同様に骨吸収が観察された (図2C)。これらの観察から、M-CSF および VEGF は共に、破骨細胞の骨吸収を支持できることが示された。

**[0042]**

It will be after administration once about rhM-CSF on the 7th as a former report (Kodama and H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45), in the femur, absorption of a lot of bone trabeculae (bone trabeculae) and the substitution to the bone marrow were accepted (FIG. 2A and 2B).

In the mouse of the latter group, the bone resorption was observed similarly (FIG. 2C).

From these observations, it was shown that both M-CSF and VEGF can support the bone resorption of the osteoclast.

**【0043】**

上記のように、成熟破骨細胞の生存とそれらの機能発現に十分な量の内因性 VEGF が産生され

**[0043]**

As mentioned above, it became clear that endogenous VEGF of sufficient quantity for survival of the mature osteoclast and those



ていることが判明した。そこで次に、rhM-CSF は内因性 VEGF の助けなしに破骨細胞を形成できるのかを調べた。12 日齢から op/op マウスの処理を開始した。前処理なしで 5  $\mu$ g の rhM-CSF を単独で 1 回投与、あるいは 5  $\mu$ g の rhM-CSF を単独、または 5  $\mu$ g の VEGFR-1/Fc と共に 12 時間おきに 6 回連続的に投与し、処理開始から 3 日後にマウスを屠殺した。大腿骨全体の中央部の縦断切片における破骨細胞数を計数した。結果は、3 個体のマウスから得た 6 切片の平均  $\pm$  標準偏差で表した。表 3 に示すように、rhM-CSF を 1 回投与したときに比べ、複数回投与すると 2 倍の数の破骨細胞が形成された。rhM-CSF と同時に VEGFR-1/Fc を投与しても、破骨細胞形成に影響を与えなかった。これらの結果は、M-CSF が in vivo で破骨細胞の分化を支持する能力を持つことを初めて明確に実証するものである。

functional expressions was produced.

It is there, next investigated whether rhM-CSF could form the osteoclast without the assistance of endogenous VEGF.

It started processing of an op/op mouse from 12 day-old.

He has no pretreatment. It administers rhM-CSF of an administration or 5 microgram for rhM-CSF of 5 microgram continuously 6 times every 12 hours with VEGFR-1/Fc of independence or 5 microgram once independently, it killed the mouse three days after the processing start.

It counted the number of osteoclast in the vertical section cut piece of the center section of the whole femur.

It expressed the result with the average  $\pm$  standard deviation of six cut pieces obtained from the mouse of three solids.

As shown in Table 3, when the multiple dose of rhM-CSF was carried out compared with the time of administering once, the osteoclast of the number of doubles was formed.

It did not affect osteoclast formation, even if it administered VEGFR-1/Fc simultaneously with rhM-CSF.

As for these results, M-CSF is. It proves clearly that it has the capability to support a differentiation of the osteoclast in-vivo for the first time.

【0044】

[0044]

【表 3】

rhM-CSF による op/op マウスの破骨細胞形成に及ぼす

[TABLE 3]

The effect of VEGFR-1 / nature administration of Fc chimeric protein which it exerts on



VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質投与 osteoclast formation of the op/op mouse by  
の効果 rhM-CSF

処理	投与回数	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	0	3±2
rhM-CSF	1	56±9
rhM-CSF	6	108±11
rhM-CSFおよびVEGFR-1/Fc	6	101±7

Process

Number of administration

Osteoclast/cut piece (average ± S.D.)

なし: None

および: And

【0045】

[0045]

[実施例4] インビトロ培養系  
における VEGF による破骨細胞  
の生成

[Example 4]

Formation of the osteoclast by VEGF in an  
in vitro culture system

M-CSF は破骨細胞の分化を

M-CSF is a differentiation of the osteoclast.

ODF / OPGL / TRANCE /

ODF / OPGL / TRANCE

RANKL ( osteoclast / RANKL(osteoclast differentiation factor /  
differentiation factor / osteoprotegerin ligand / TNF-related  
osteoprotegerin ligand / activation-induced cytokine

RANKL(osteoclast differentiation factor /  
osteoprotegerin ligand / TNF-related  
activation-induced cytokine

TNF-related activation-induced  
cytokine / receptor activator of

It cooperates with /receptor activator of nuclear  
factor B ligand (kappa).

nuclear factor  $\kappa$  B ligand) と共  
同して支持することが明らかと  
なっている (Yasuda, H et al.

Supporting is clear (Yasuda, H et  
al.1998.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95:3597;  
Lacey, D.L.et al.1998.Cell.93:165).

1998. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA. 95:3597; Lacey, D.L. et  
al. 1998. Cell. 93:165)。そこで、

Then, whether rhVEGF165 can substitute for  
rhM-CSF in formation of the osteoclast was  
investigated using in-vitro culture system of



rhVEGF165 が、破骨細胞の生成において rhM-CSF を代替できるかを、非付着性骨髄細胞の in vitro 培養系を用いて調べた。rhVEGF165 および rhM-CSF をウシ胎仔血清 (FBS) にそれぞれ  $2 \mu\text{g/ml}$  および  $200\text{ng/ml}$  の濃度に溶かした。96 ウェルプレート各ウェルを  $5 \mu\text{l}$  のいずれかのサイトカイン溶液または FBS でコートし、30 分間風乾した。5~8 週齢の雄 ddY マウス (埼玉実験動物供給所株式会社 (埼玉県北葛飾郡杉戸町) より入手) の脛骨および大腿骨から得た骨髄細胞を、Ly および Mishell (Ly, I.A. and R.I. Mishell, 1974. J. Immunol. Methods. 5:239) の記載に従ってセファデックス G-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) カラムに通した。非付着細胞を  $1 \times 10^5 \text{cell/well}$  の密度となるようサイトカインでコートしたウェルに播き、 $100\text{ng/ml}$  の組換えヒト RANK リガンド (rhRANKL, PeproTec, London, UK) の存在下または非存在下、15% の FBS を含む  $\alpha$ -MEM で 7 日間培養した。rhVEGF165 および rhM-CSF の最終濃度はそれぞれ  $100\text{ng/ml}$  および  $10\text{ng/ml}$  とした。培養細胞は上記 4% パラホルムアルデヒドで固定し、上記に通り TRAP で染色した。ま

non-sticking-property myeloid cells. It melted rhVEGF165 and rhM-CSF to the fetal bovine serum (FBS) at the density of 2 microgram(s)/ml and 200 ng/ml, respectively. It coats each well of 96 well plate by the cytokine solution in any one of 5 microliter, or FBS, it carried out the air drying for 30 minutes. The myeloid cells obtained from the tibia and femur of a 5 to 8 week-old male ddY mouse (it acquires from Saitama experimental-animal supply place incorporated company (Sugitomachi, Kita-Katsushika-gun, Saitama-ken)), Ly and Mishell (Ly, I.A.) According to the statement of and residual-inhibition. Mishell, 1974. J. Immunol. Methods. 5:239, it let it pass in G-SEPHADEX 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) column. It scatters to the well which coated the non-adherent cell by cytokine so that it might become a density of  $1 \times 10^5 \text{cell/well}$ , the 100 ng/ml recombinant human RANK ligand (rhRANKL, PeproTec, London, UK) in presence or in absence and cultivated for seven days by (alpha)- MEM containing 15% of FBS. The final concentration of rhVEGF165 and rhM-CSF was 100 ng/ml and 10 ng/ml, respectively. It fixes a cultured cell with the above-mentioned 4% paraformaldehyde, it passed above and dyed by TRAP. Moreover, it carries non-adhering myeloid cells on the slice of the dentine of diameter 5 mm, it put on 24 well plate and cultivated for seven days in the same manner to the above. As the reflection-electron (backscattered

た、直径 5mm の象牙質のスライス上に非付着骨髄細胞をのせ、24 ウェルプレートに置き、上記と同様に 7 日間培養した。スライスは反射電子 (backscattered electron) 顕微鏡により以前記載したようにして観察した (Amano, H. et al. 1998. J. Bone Miner. Res.13:846)。

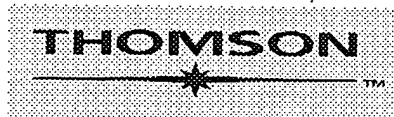
electron) microscope indicated the slice before, it observed it (Amano and H. et al.1998.J.Bone Miner.Res.13:846).

## 【0046】

これまでの知見 (Yasuda, H et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3597; Lacey, D.L. et al. 1998. Cell. 93:165) と一致して、rhM-CSF または rhRANKL が単独で存在しても、TRAP 陽性細胞は認められなかった。rhVEGF165 単独でも破骨細胞の分化を支持できなかった (図 3A)。rhVEGF165 と rhRANKL の組み合わせは、TRAP 陽性細胞の生成を支持した (図 3B)。その細胞のサイズは、rhM-CSF と rhRANKL の存在下で生成された細胞と比べ有意に小さかった (図 3C)。結果として、rhVEGF165 と rhRANKL により支持された破骨細胞は、rhM-CSF と rhRANKL によるものに比べ、小さな吸収窩を形成した (図 3D および 3E)。これらの結果から、VEGF は確かに ODF / OPGL / TRANCE / RANKL と共同して破骨細胞を

## [0046]

It is in agreement with an old realization (Yasuda, H et al.1998.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95:3597; Lacey, D.L.et al.1998.Cell.93:165), even if rhM-CSF or rhRANKL existed independently, the TRAP positive cell was not accepted. RhVEGF165 independent one was not able to support a differentiation of the osteoclast (FIG. 3A). The combination of rhVEGF165 and rhRANKL supported formation of the TRAP positive cell (FIG. 3B). The size of the cell was significantly small compared with rhM-CSF and the cell formed in the presence of rhRANKL (FIG. 3C). As a result, the osteoclast supported by rhVEGF165 and rhRANKL formed the small absorption cavity compared with what depends on rhM-CSF and rhRANKL (FIG. 3D and 3E). To be sure, these results to VEGF is. In collaboration with ODF /OPGL/TRANCE/RANKL, it was proved in the osteoclast that it could support a differentiation.



分化を支持できることが実証された。

# 【0047】

【実施例5】 加齢に伴う op/op マウスの破骨細胞増加における内因性 VEGF の効果

本実施例では、加齢と共に op/op マウスの破骨細胞が増加し、骨大理石病が改善する (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Begg, S.K. et al. 1993. J. Exp. Med. 177:237) のは、内因的に産生される VEGF によるものなのかを調べた。2 カ月齢の op/op マウスに 100  $\mu$ g のヤギ抗マウス VEGF ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を 12 時間おきに 5 回連続的に投与した。対照として、ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を上記と同様に投与した。別の群のマウスには、5  $\mu$ g の rhVEGF165 の単回投与を行った。これらすべてのマウスは、処理の開始 3 日後に屠殺した。

# 【0048】

加齢の進んだマウスの大腿骨切片の大きさは幼若マウスの約 1.6 倍であったが、図 4A に示すように、2 週齢の op/op マウスの大腿骨 (表 1 および 3) に比

# [0047]

[Example 5]

Effect of endogenous VEGF in the increase in the osteoclast of the op/op mouse accompanying the aging

In this Example, the osteoclast of an op/op mouse increases with the aging, a bone marble bone disease improves (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Begg, S.K. et al. 1993. J. Exp. Med. 177:237), it investigated whether it was what depends on VEGF produced endogenously.

It administered continuously the goat anti-mouse VEGF polyclonal antibody (R&D Systems) of 100 microgram 5 times every 12 hours to the op/op mouse of age for two months.

As a control, it administered Goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in the same manner to the above.

It performed the single administration of rhVEGF165 of 5 microgram to the mouse of another group.

It killed all these mice three days after the start of processing.

# [0048]

The magnitude of the femur cut piece of the mouse with which the aging progressed was about 1.6 times the juvenile mouse.

However, as shown in FIG. 4A, compared with the femur (Tables 1 and 3) of a 2 week-old





べ、2ヵ月齢の op/op マウス (28  $\pm$  1 破骨細胞/切片) では有意に多数の 2~3 核の小さな破骨細胞が観察された。それに加えて、骨髓(marrow space)にはTRAP陽性の単核細胞がしばしば観察された。

#### 【0049】

100  $\mu$ g のヤギ抗 VEGF ポリクローナル抗体を 12 時間おきに 5 回投与したところ、破骨細胞数は有意に減少した (4  $\pm$  2 破骨細胞/切片) (図 4B)。ヤギ IgG の投与では破骨細胞数に変化はなかった。2 週齢の変異マウス (表 2) のときと同様に VEGFR-1/Fc を投与したところ、破骨細胞数に変化は認められなかった。5  $\mu$ g の rhVEGF165 の 1 回の投与は破骨細胞をさらに形成させた (64  $\pm$  5 破骨細胞/切片) (図 4C) ことは、2ヵ月齢の op/op マウスの大腿骨の VEGF レベルは、破骨細胞を最大限形成するにはまだ不十分であることを示している。これらの結果から、機能的な M-CSF を欠損する op/op マウスにおいて、VEGF は自発的な破骨細胞の形成を引き起こすことが実証された。加齢に伴い破骨細胞数が変化することや、2 週齢マウスと 2ヵ月齢マウスで内因性 VEGF を中和するのに必要な VEGFR-1/Fc の量が異なる

op/op mouse, the osteoclast with many two to 3 significantly small nuclei was observed for two months with the op/op mouse (28  $\pm$  1 osteoclast / cut piece) of age.

In addition to it, the monocyte of the TRAP positivity was often observed by the bone marrow (marrow space).

#### [0049]

When the goat anti- VEGF polyclonal antibody of 100 microgram was administered 5 times every 12 hours, the number of osteoclast reduced significantly (FIG. 4B (4  $\pm$  2 osteoclast / cut piece)).

In an administration of Goat IgG, it was changeless to the number of osteoclast.

When VEGFR-1/Fc was administered like the time of a 2 week-old mutant mouse (Table 2), the variation was not accepted in the number of osteoclast.

One administration of rhVEGF165 of 5 microgram is what (FIG. 4C (64  $\pm$  5 the osteoclast/cut piece)) it formed the osteoclast for further, in order for the VEGF level of the femur of the op/op mouse of age to form the osteoclast upper limit for two months, the still inadequate thing is shown.

In the op/op mouse which suffers deficit a loss in functional M-CSF from these results, it was proved that VEGF caused formation of the spontaneous osteoclast.

Since the quantity of VEGFR-1/Fc required in order for the number of osteoclast varying in connection with the aging, and the 2-week-old mouse and a two-month age mouse to neutralize endogenous VEGF differs, it is

ことから、加齢の進んだマウスで VEGF 産生のレベルが上昇していることが示唆される。ただし、破骨細胞前駆細胞の VEGF に対する感受性が加齢によって変化している可能性は否定できない。

## 【0050】

[実施例6] VEGF によって誘導された破骨細胞の微細形態  
上記のように、op/op マウスに遺伝子組換え型ヒト VEGF (rhVEGF) を投与すると、破骨細胞の形成機能が回復し、osteopetrosis の症状は改善された。このことは、rhVEGF で誘導された破骨細胞はその機能も回復していることを示唆している。そこで、この実験系で誘導された破骨細胞を微細形態学的に確認するため、電子顕微鏡による観察を行った。op/op マウスに 5  $\mu$ g/body の rhVEGF を腹腔投与して 4 日後、op/op マウスを 2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド (in 0.1M cacodylate buffer, pH7.4) で灌流固定をし、大腿骨を摘出後 1%オスミウム酸による後固定を施した。その後 10%EDTA で 2 週間の脱灰を行い、骨組織を Epon812 樹脂に包埋をし、電顕試料とした。

suggested that the level of a VEGF production is rising with the mouse with which the aging progressed.

However, the sensitivity with respect to VEGF of an osteoclast progenitor cell cannot deny possibility of varying with aging.

## [0050]

## [Example 6]

Detailed form of the osteoclast derived by VEGF

As mentioned above, if the gene recombinant type human VEGF (rhVEGF) is administered to an op/op mouse, the formation function of the osteoclast will be recovered, the symptom of osteopetrosis has improved.

It has suggested that its function has also recovered the osteoclast to which this was derived by rhVEGF.

Then, in order to confirm minutely morphologically the osteoclast derived by this experiment type, it performed the observation by an electron microscope.

Four days after carrying out the abdominal administration of the rhVEGF of 5 microgram/body, it carries out perfusion fixation for an op/op mouse to an op/op mouse by a 2% paraformaldehyde 2% glutaraldehyde (in 0.1M cacodylate buffer, pH7.4), it gave post-fixation according a femur to the after-extraction 1% osmic acid.

After that, it performs deliming for two weeks by EDTA 10%, and embeds a bone tissue to Epon812 resin, it considered it as the electron-microscope sample.



## 【0051】

VEGF で誘導した破骨細胞は小型で核数の少ないものがほとんどであったが、骨面に接する側に発達した波状縁 (ruffled border: 図 5, rb) とそれを取り囲む明帯 (clear zone: 図 5, cz) が認められる。また、細胞質中には多数のミトコンドリア(mt) が観察され、それらの間にはゴルジ装置が観察され活発な破骨細胞の特色が示されていた。これらの所見から VEGF によって誘導された破骨細胞は小型であるがその機能を満たすべく形態学的特長を有していることが示された。

## 【0052】

[実施例 7] VEGF の成熟破骨細胞に対する活性効果についての検討

成熟破骨細胞に対しての VEGF の効果を調べるため、単離した成熟破骨細胞を用いた培養系で実験を行った。破骨細胞の単離は Chambers ら (Chambers T.J. and Magnus C.J.: J. Pathology 136, 27-39, 1982) の方法に準じ、ラット下肢骨より採取した。概略を説明すると生後 1 日齢 Wistar 系ラットを断頭屠殺し、左右頸骨、大腿骨を取り出し、M199 培地を入れたシャーレに入れて、外科用メスを用いて筋

## [0051]

The osteoclast derived by VEGF was small and the thing with less the number of nuclei was almost the case.

However, the wavelike edge (ruffled border: FIG. 5 and rb) which developed into the side which touches a bone surface, and the clear zone (clear zone: FIG. 5 and cz) which encloses it are accepted.

Moreover, many mitochondrias (mt) are observed in the cytoplasm, the Golgi apparatus was observed among them and the special feature of the active osteoclast was shown.

Having the morphological feature was shown in order to fill its function, although the osteoclast derived by VEGF from these findings are small.

## [0052]

[Example 7]

Examination about the active effect with respect to the mature osteoclast of VEGF

In order to investigate the effect of VEGF to the mature osteoclast, it conducted experiment by the culture system using the isolated mature osteoclast.

According to the procedure of Chambers and others (Chambers T.J. and Magnus C.J.: J. Pathology 136, 27-39, 1982), it collected the isolation of the osteoclast from rat bones of the inferior limb.

Description of an outline will carry out the decapitation killing of the 1 day-old of after-the-birth Wistar type rat, it takes out right-and-left tibia and a femur, it puts into the



肉等骨付着物を除去した。新しい M199 培地中にて骨をさらに細かく切り刻み、その上清（骨系細胞を含むけん濁液）を集め、遠心により骨系細胞を得た。この骨系細胞に 25mM HEPES buffer (pH7.0)で調整した 10% FBS を含む M199 培地で再びけん濁させ、カバースリップに乗せ、恒温培養器にて、37°C、大気中、1 時間付着させた。10% FBS を含む M199 培地で洗い、破骨細胞とその前駆細胞を接着性の差により骨芽細胞など他の細胞より単離した。この単離した破骨細胞は 15%FBS を含む IB 培地にて培養した。この培養系に対し 20ng/ml の M-CSF を添加した群と 100ng/ml の VEGF を添加した群でそれぞれの反応を比較観察した。

#### 【0053】

単離して培養液の中に移した破骨細胞は比較的小型の細胞形態を示していた（図 6 a）。M-CSF 添加群では、添加直後から細胞の伸展がはじまり、細胞同士の融合も観察された。伸展は細胞周囲全体で起こっていた。添加 1 分後には多数の核を有する大

Petri dish into which it put M199 medium, it eliminated bone attachments, such as muscles, using the scalpel for surgery.

It chopped up the bone still more finely in new M199 medium, collected the supernatant (suspension containing the bone system cell), and obtained the bone system cell by centrifugation.

It makes it suspend again by M199 medium which was adjusted to this bone system cell by 25 mM HEPES buffer (pH7.0) and which contains FBS 10%.

It puts on a cover slip, it made it adhere among 37 degrees C and atmospheric air in a homiothermal incubator for 1 hour.

It washed by M199 medium which contains FBS 10%, and isolated the osteoclast and its progenitor cell from other cell, such as osteoblast, according to the adhesive difference.

It cultured this isolated osteoclast in IB medium which contains FBS 15%.

It carried out the comparison observation of each reaction by the group which added 20 ng/ml M-CSF to this culture system, and the group which added 100 ng/ml VEGF.

#### [0053]

The osteoclast which isolated and was moved into the culture solution showed the small-sized cell form comparatively (FIG. 6 a).

By the M-CSF adding group, extension of the cell began from immediately after adding, and fusion of cell was also observed.

Extension had taken place in the whole perimeter of the cell.



型の細胞に変化した (図 6 b)。さらに、30 分、60 分と経過してもその形態に変化は見られなかった (図 6 c-d)。一方、VEGF 添加群では、添加から 10 分経過してもまったく変化は見られず (図 6 f)、添加から 20 分経過したところで細胞周囲の一部に伸展が観察された (図 6 g、矢印)。さらに 60 分後にはその伸展がより明瞭になった (図 6 h、矢印)。In vitro における破骨細胞の伸展現象は骨吸収機能の活性と相同しているという考えもあることから、VEGF は、M-CSF のような即効性はないものの成熟破骨細胞に対して緩やかに作用して骨吸収機能を発現することを示唆した。この現象は op/op マウスでは破骨細胞が加齢とともに少しずつ出現してくること、しかもその細胞が小型であることと深い関連があることを示唆している。

【0054】

## 【発明の効果】

本発明により、VEGFR-1 が破骨細胞の形成や生存、ならびに骨吸収に密接に関わっていることが明らかになった。また、VEGFR-1 の活性化を制御することにより、破骨細胞の形成や生存を調節し、骨吸収を制御するための新しい方法および薬剤

It varied to the large sized cell which has many nuclei 1 minute after adding (FIG. 6 b).

Furthermore, the variation was not looked at by the form even if it elapsed with 30 minutes and 60 minutes (FIG. 6 c-d).

On the other hand, by the VEGF adding group, even if it elapsed from adding for 10 minutes, the variation was not seen at all (FIG. 6 f), but extension was observed by a part of perimeter of the cell in the place elapsed from adding for 20 minutes (FIG. 6 g, arrow head).

Furthermore, 60 minutes afterward, the extension became clearer (FIG. 6 h, arrow head). Since there is the philosophy that the extension phenomenon of the osteoclast in vitro is homologous to activity of bone-resorption function, VEGF suggested the expression of a bone-resorption function, acting gently to the mature osteoclast, although it has no immediate effect like M-CSF. This phenomenon has suggested that the osteoclast appears little by little with the aging, that that cell is moreover small, and that there is deep relation with the op/op mouse.

[0054]

## [ADVANTAGE OF THE INVENTION]

By this invention, it became clear that VEGFR-1 is concerned with an intimate contact at formation, survival, and the bone resorption of the osteoclast.

Moreover, it adjusts formation and survival of the osteoclast by controlling activation of VEGFR-1, the new procedure and new medicine for controlling the bone resorption



が提供された。また本発明により、骨吸収を制御する新規な化合物をスクリーニングする方法が提供された。本発明の薬剤は、骨吸収の異常を伴う種々の疾患の予防や治療に用いられうる。また、VEGFR-1 やそのリガンドである VEGF および PIGF-1 の発現量は、骨代謝に深く関わることから、これらの蛋白質レベルの検査などを通して骨代謝の異常を診断することも考えられる。また、本発明のスクリーニング方法により、血管誘導を制御する薬剤をスクリーニングすることも可能である。

were offered.

Moreover, the procedure of screening the new compound which controls the bone resorption by this invention was offered. The medicine of this invention is used for the prevention and the treatment of the various illness accompanying deviation of the bone resorption, and it deals in it. Moreover, since the expression level of VEGF, VEGFR-1 which is its ligand, and PIGF-1 is deeply concerned with bone metabolism, diagnosing the deviation of bone metabolism through an inspection of these protein levels etc. is also considered. Moreover, it can also screen the medicine which controls a blood-vessel derivative by the screening procedure of this invention.

#### 【図面の簡単な説明】

#### [BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

##### 【図 1】

大腿骨切片の VEGFR に対する免疫組織化学染色を示す図である。3 週齢 +/- マウスの大腿骨の縦断切片を、抗 VEGFR-1 ポリクローナル抗体 (A)、AVAS12 抗 VEGFR-2 モノクローナル抗体 (B)、またはウサギ IgG (C) で染色した。矢尻は破骨細胞を示し、矢印は内皮細胞を示している。倍率 238 倍。

##### [FIG 1]

It is a figure showing immune-tissue chemistry dyeing with respect to VEGFR of a femur cut piece.

3 week-old +/-

It dyed the vertical section cut piece of the femur of a mouse by anti- VEGFR-1 polyclonal-antibody (A), AVAS12 anti- VEGFR-2 monoclonal-antibody (B), or rabbit IgG(C).

An arrowhead shows the osteoclast, the arrow head shows endothelial cell.

One 238 times the multiplying factor of this

##### 【図 2】

内因性 VEGF または外来性 rhM-CSF の支持による破骨細胞の op/op マウス大腿骨小柱の

##### [FIG 2]

It is a figure showing the bone resorption of the op/op mouse femur trabecula of the osteoclast by support of endogenous VEGF or foreign



骨吸収を示す図である。マウスの処理は 12 日齢から開始し、19 日齢で屠殺した。大腿骨の縦断切片を Mallory のアザンで染色した。各顕微鏡写真は 3 個体から得た大腿骨の群を示している。(A) 未投与；(B) 12 日齢に  $5\mu\text{g}$  の rhM-CSF を 1 回投与；(C) 12 日齢に  $5\mu\text{g}$  の rhM-CSF を 1 回投与し、16～18 日齢に VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質と rhM-CSF を各  $5\mu\text{g}$ 、12 時間おきに 6 回連続的に投与。倍率は 20 倍。

rhM-CSF.

It starts processing of a mouse from 12 day-old, it killed at 19 day-old.

It dyed the vertical section cut piece of the femur by Azan of Mallory.

Each microscope picture shows the group of the femur obtained from three solids.

(A) Un-administering.;

(B) Administer rhM-CSF of 5 microgram once to 12 day-old.;

(C) Administer rhM-CSF of 5 microgram once to 12 day-old, it administers continuously VEGFR-1 / nature of Fc chimeric protein, and rhM-CSF 6 times every 12 hours 5 microgram each to 16 to 18 day-old.

A multiplying factor is 20 times.

### 【図 3】

破骨細胞のインビトロ生成を支持する VEGF の能力を示す図である。非付着骨髄細胞を、96 ウェルプレート (A～C) または象牙質スライス (D,E) 上で、rhVEGF165 単独 (A)、rhVEGF165 と rhRANKL (B および D)、または rhM-CSF と rhRANKL (C および E) の存在下で 7 日間培養した。培養物は TRAP 活性による染色 (A～C)、または反射電子顕微鏡を用いた観察を行った (D,E)。(D) 中の矢印は小吸収窩を示している。倍率 24 倍 (A～C)。(D) と (E) のバーは、 $50\mu\text{m}$  である。

### 【FIG 3】

It is a figure showing the capability of VEGF which supports in vitro formation of the osteoclast.

About non-adhering myeloid cells, it is on 96 well plate (A-C) or a dentine slice (D, E), it cultivated for seven days in the presence of rhVEGF165 (A) by itself, rhVEGF165 and rhRANKL (B and D), or rhM-CSF and rhRANKL (C and E).

The culture performed dyeing (A-C) by TRAP activity, or the observation using a reflection-electron microscope (D, E).

(D) The inner arrow head shows the small absorption cavity.

One 24 times (A-C) the multiplying factor of this The burr of (D) and (E) is 50 micrometer.

### 【図 4】

### 【FIG 4】

2ヶ月齢 op/op マウス大腿骨における、内因的に産生される VEGF に対する破骨細胞の依存性を示す図である。マウスは処理開始3日後に屠殺した。大腿骨の縦断切片を TRAP 活性により染色し、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。各顕微鏡写真は、3個体から得た大腿骨の群を示している。(B)中の矢印は、単核の TRAP 陽性細胞を示している。(A) 未投与；(B) 12 時間おきに連続的に 5 回、100  $\mu$ g の抗 VEGF ポリクローナル抗体を投与；(C) 5  $\mu$ g の rhVEGF165 を 1 回投与。倍率 103 倍。

It is a figure in a two-month age op/op mouse femur showing the dependence of the osteoclast with respect to VEGF produced endogenously.

It killed the mouse three days after the processing start.

TRAP activity dyes the vertical section cut piece of a femur, it performed counter dyeing by the hematoxylin.

Each microscope picture shows the group of the femur obtained from three solids.

(B) The inner arrow head shows the TRAP positive cell of the single nucleus.

(A) Un-administering.;

(B) Administer anti- VEGF polyclonal antibody of 100 microgram 5 times continuously every 12 hours.;

(C) Administer rhVEGF165 of 5 microgram once.

One 103 times the multiplying factor of this

#### 【図 5】

VEGF によって誘導された破骨細胞の微細形態を示す図である。op/op マウスに rhVEGF を腹腔内投与して4日後の大腿骨を摘出し電顕観察を行った。骨 (Bone)、核 (Nu)、ミトコンドリア (mt)、波状縁 (ruffled border: rb)、および明帯 (clear zone: cz) を示した。

#### 【FIG 5】

It is a figure showing the detailed form of the osteoclast derived by VEGF.

It extracted the femur four days after intraperitoneally administering rhVEGF to an op/op mouse, and performed the electron-microscope observation.

A bone (Bone), the nucleus (Nu), the mitochondria (mt), the wavelike edge (ruffled border: rb), and the clear zone (clear zone: cz) were shown.

#### 【図 6】

成熟破骨細胞に対する VEGF の活性効果を示す図である。生後

#### 【FIG 6】

It is a figure showing the active effect of VEGF with respect to the mature osteoclast.



1日齢ラット下肢骨より破骨細胞を単離し、15%FBSを含むIB培地にて培養した。この培養系に対し20ng/mlのM-CSFを添加した群と100ng/mlのVEGFを添加した群でそれぞれの反応を比較観察した。M-CSF添加前

(a) および添加後1(b)、30(c)、および60(d)分後、VEGF添加前(e)、および添加後10(f)、20(g)、および60(h)分後の破骨細胞(oc)を示す。

It isolates the osteoclast from 1 day-old of after-the-birth rat bones of the inferior limb, it cultivated in IB medium which contains FBS 15%. It carried out the comparison observation of each reaction by the group which added 20 ng/ml M-CSF to this culture system, and the group which added 100 ng/ml VEGF.

The osteoclast (oc) before M-CSF adding (a), in 1 minute after adding (b), in 30 minutes after adding (c), in 60 minutes after adding (d), before VEGF (e), in 10 minutes after adding (f), in 20 minutes after adding (g), and in 60 minutes after adding (h) is shown.

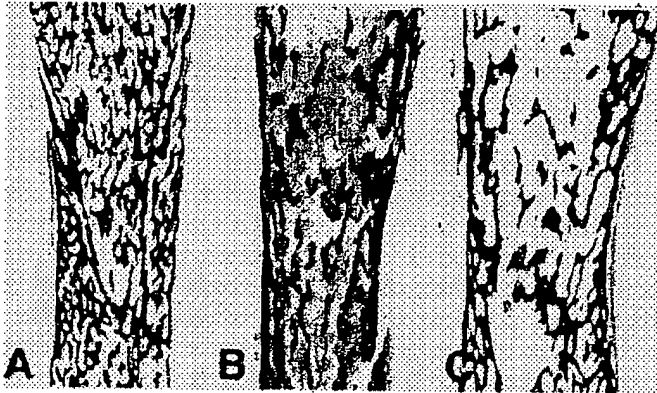
【図1】

[FIG 1]



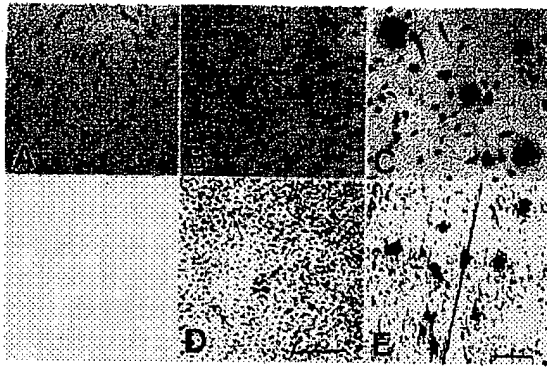
【図2】

[FIG 2]



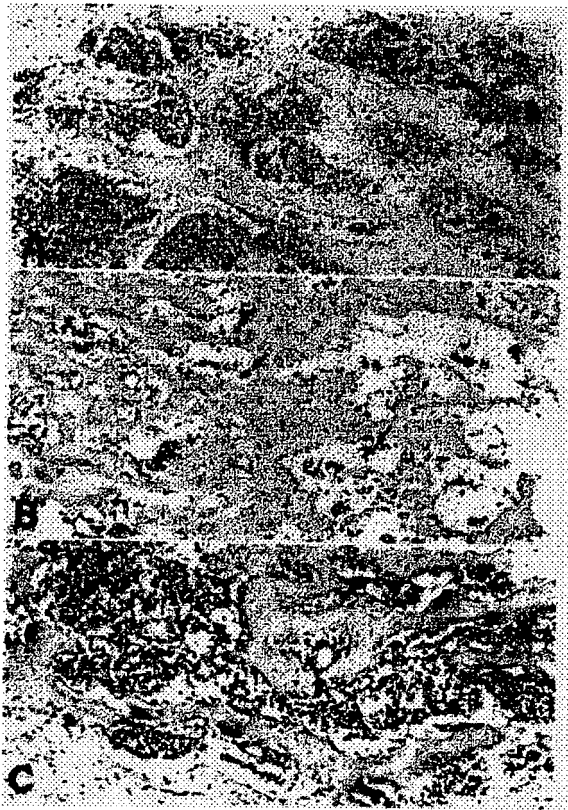
【図 3】

[FIG 3]



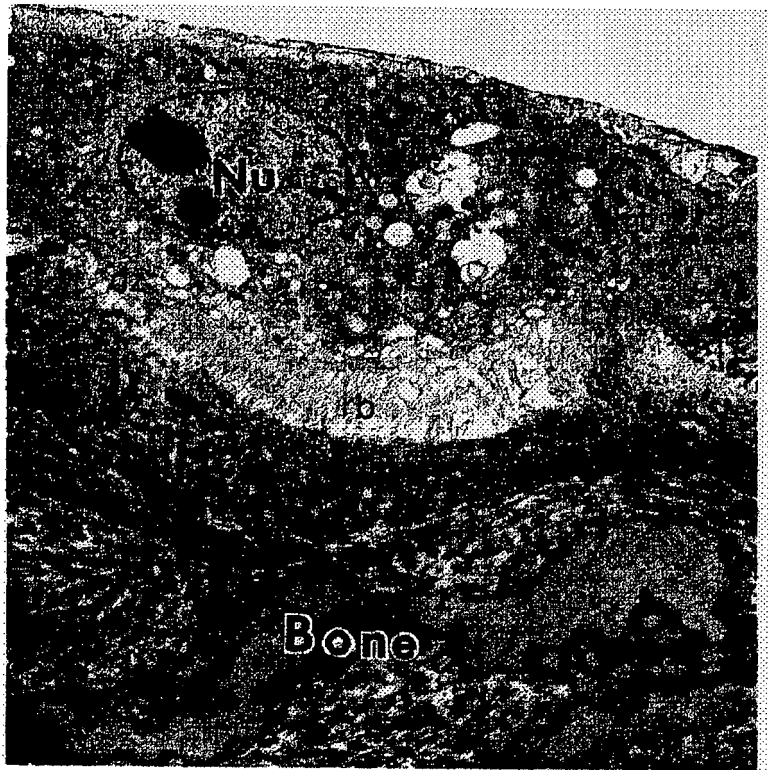
【図 4】

[FIG 4]



【図 5】

[FIG. 5]



【図 6】

[FIG. 6]





## THOMSON SCIENTIFIC TERMS AND CONDITIONS

*Thomson Scientific Ltd shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Thomson Scientific translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Thomson Scientific Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our website:

["www.THOMSONDERWENT.COM"](http://www.THOMSONDERWENT.COM) (English)

["www.thomsonscientific.jp"](http://www.thomsonscientific.jp) (Japanese)